

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 466**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011 E 11733335 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2524232**

54 Título: **Procedimientos para predecir la respuesta al tratamiento del cáncer de mama triple negativo**

30 Prioridad:

04.06.2010 US 351838 P

27.04.2010 US 328602 P

19.04.2010 US 325624 P

12.01.2010 US 294433 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.10.2014

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)

Avenue Nestlé 55

1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

LIU, XINJUN;

KIM, PHILLIP;

KIRKLAND, RICHARD;

LEE, TANI;

YBARRONDO, BELEN y

SINGH, SHARAT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 505 466 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para predecir la respuesta al tratamiento del cáncer de mama triple negativo

5 Antecedentes de la invención

10 El proceso de transducción de señales de las células es responsable de diversas funciones biológicas, incluidas la división y la muerte celular, el metabolismo, la activación de células inmunitarias, la neurotransmisión y la percepción sensorial, por mencionar algunas. En consecuencia, los desarreglos en la transducción de señales normal de las células pueden dar lugar a una serie de estados patológicos tales como diabetes, cardiopatías, autoinmunidad y cáncer.

15 Una ruta de transducción de señales bien caracterizada es la ruta de las MAP cinasas, que se encarga de transducir la señal desde el factor de crecimiento epidérmico (EGF) hasta la estimulación de la proliferación celular en las células (véase la figura 1 de la publicación PCT N° WO2009/108637, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines). El EGF se une a una tirosina cinasa unida a un receptor transmembranario, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se activa por la unión al EGF. La unión del EGF al EGFR activa la actividad tirosina cinasa del dominio citoplásmico del receptor. Una consecuencia de esta activación de la cinasa es la autofosforilación del EGFR en los residuos de tirosina. Los residuos de tirosina fosforilados del EGFR activado proporcionan un sitio de anclaje para la unión del dominio SH2 que contienen proteínas adaptadoras, tales como la GRB2. En su función como adaptador, la GRB2 se une además a un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, SOS, por medio de un dominio SH3 de GRB2. La formación del complejo de EGFR-GRB2-SOS conduce a la activación por SOS de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que estimula la eliminación del GDP de Ras. Tras la salida del GDP, Ras se une a GTP y queda activada.

25 Después de la activación, Ras se une y activa la actividad proteína cinasa de la RAF cinasa, una proteína cinasa específica de serina y treonina. A continuación se produce la activación de una cascada de proteínas cinasas que da lugar a la proliferación celular. De forma esquemática, a continuación, la cinasa RAF fosforila y activa a MEK, otra serina/treonina cinasa. La MEK activada fosforila y activa la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Entre los objetivos de fosforilación adicional por MAPK se encuentra la cinasa S6 de la proteína ribosómica 40S (RSK). La fosforilación de RSK por MAPK da lugar a la activación de RSK, que a su vez fosforila la proteína ribosómica S6. Otro objetivo conocido de MAPK es el protooncogén c-Myc, un gen importante para la proliferación celular, que aparece mutado en diversos tipos de cáncer. La MAPK también fosforila y activa otra proteína cinasa, MNK, que a su vez fosforila el factor de transcripción CREB. De forma indirecta, MAPK también regula la transcripción del gen Fos, que codifica otro factor de transcripción más implicado en la proliferación celular. Al modificar los niveles y actividades de estos factores de transcripción, MAPK transduce la señal extracelular original desde el EGF hacia la transcripción modificada de genes que son importantes para el avance del ciclo celular.

40 Dado el papel esencial que desempeñan las rutas de transducción de señales en la proliferación celular, no es sorprendente que muchos cánceres se produzcan como consecuencia de mutaciones y otras modificaciones de los componentes de la transducción de señales que dan lugar a la activación anómala de las rutas de proliferación celular. Por ejemplo, se ha asociado la sobreexpresión o la hiperactividad del EGFR con una serie de cánceres, incluidos el glioblastoma multiforme, el cáncer de colon y el cáncer de pulmón. Esto ha inspirado el desarrollo de tratamientos antineoplásicos contra el EGFR, incluidos egefitinib y erlotinib para el cáncer de pulmón y cetuximab para el cáncer de colon.

45 El cetuximab es un ejemplo de inhibidor de anticuerpo monoclonal, que se une al dominio extracelular de unión a ligandos del EGFR, de modo que evita la unión de ligandos que activan la tirosina cinasa del EGFR. En contraste, gefitinib y erlotinib son moléculas pequeñas que inhiben la tirosina cinasa del EGFR intracelular. En ausencia de actividad cinasa, el EGFR no se puede autofosforilar en los residuos de tirosina, lo que es un requisito previo para la unión de las proteínas adaptadoras posteriores, tales como GRB2. La interrupción de la cascada de señalización de las células que independen de esta ruta para proliferar, disminuye la migración y la proliferación de tumores.

50 Adicionalmente, en otros estudios se ha demostrado que aproximadamente el 70 % de los melanomas humanos y una fracción menor de otros tumores tienen una mutación puntual (V599E) en el gen Raf que da lugar a la activación persistente de la ruta de las MAPK (véase, p. ej., Davies et al., Nature, 417:949-954 (2002)). Estos resultados apuntan a que las mutaciones en rutas de transducción de señales concretas pueden ser características de tipos de tumores concretos y que estas rutas de transducción de señales modificadas específicas pueden ser un objetivo prometedor para la intervención quimioterápica. En el artículo "Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up", de Ryden L. et al. (BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 120, N° 2, 5 de febrero de 2010 (05-02-2010), páginas 491-498) se informa sobre un estudio de la prevalencia de biomarcadores candidatos de interés médico en tumores de pacientes con cáncer de mama triple negativo (CMTN), que incluyen los biomarcadores ER, PR, HER2, el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y el receptor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares 2 (VEGFR2). Ryden L. et al. han publicado el artículo "Vascular endothelial growth factor receptor 2 is a significant

negative prognostic biomarker in triple-negative breast cancer: results from a controlled randomised trial of premenopausal breast cancer" (CANCER RESEARCH, vol. 69, N° 2, supl. 1, 15 de enero de 2009). En el artículo se informa de que el VEGFR2 era un biomarcador pronóstico significativo en pacientes con CMTN. El análisis adicional de EGFR, VEGF-A y PDGFR β no añadió ninguna información de pronóstico para los pacientes con CMTN de este estudio.

Dado que los diferentes tratamientos contra el cáncer, en particular la quimioterapia contra el cáncer, pueden funcionar directa o indirectamente ya sea por medio del bloqueo o bien de la activación de rutas celulares de transducción de señales implicadas en la proliferación o la muerte celular, respectivamente, la actividad de una ruta de transducción de señales dada en una forma de cáncer en particular puede servir como un buen indicador de la eficacia de diversos tratamientos contra el cáncer. En consecuencia, además de satisfacer otras necesidades, la presente invención proporciona procedimientos para predecir y evaluar la eficacia de posibles tratamientos antineoplásicos para un paciente individual. Como tal, la presente invención proporciona procedimientos para ayudar al médico a seleccionar un tratamiento contra el cáncer adecuado a la dosis correcta y en el momento adecuado para cada paciente.

Breve resumen de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para predecir la respuesta de un tumor de mama triple negativo frente al tratamiento con un fármaco antineoplásico, comprendiendo el procedimiento:

(a) lisar una célula tumoral obtenida a partir del tumor de mama triple negativo para producir un extracto celular;

(b) determinar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular; y

(c) comparar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular determinado en la etapa (b) con un nivel de expresión de VEGFR2 de referencia,

en el que la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo en comparación con la referencia es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico, en el que el fármaco antineoplásico es una combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel.

La etapa (b) puede comprender además determinar el nivel de expresión de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R en el extracto celular.

En el procedimiento de la invención, la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo, un nivel de expresión de HER1 alto y/o un nivel de expresión de IGF-1R bajo en el extracto celular en comparación con un nivel de expresión de c-KIT, HER1 o IGF-1R de referencia es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico.

El paclitaxel puede ser paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (nab).

El nivel de expresión de referencia se puede calcular con una curva de calibrado generada a partir de una línea celular cancerosa, curva de calibrado que, opcionalmente, se genera a partir de varias concentraciones de extracto celular diluido en serie preparado a partir de la línea celular cancerosa, línea celular cancerosa que, opcionalmente, expresa VEGFR2, c-KIT, HER1 y/o IGF-1R.

El procedimiento puede comprender además determinar el grado de activación de VEGFR2, c-KIT, HER1, IGF-1R y/o AKT en el extracto celular.

El procedimiento puede comprender además determinar el nivel de expresión y/o el grado de activación de una o más moléculas de transducción de señales adicionales en el extracto celular.

Las una o más moléculas de transducción de señales adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en HER2, p95HER2, HER3, HER4, PI3K, AKT, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, P70S6K, GSK-3 β , Shc, c-MET, VEGFR1, VEGFR3, a dímero receptor y combinaciones de las mismas.

La célula tumoral puede ser una célula tumoral circulante o una célula obtenida del tumor de mama triple negativo mediante una biopsia por aspiración con aguja fina (AAAF).

La célula tumoral se puede aislar a partir de una muestra, opcionalmente obtenida de un sujeto con cáncer de mama triple negativo metastásico, muestra que, opcionalmente, es sangre entera, suero, plasma o una muestra de tejido tumoral.

La presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo puede ser un factor pronóstico de una duración mayor de la supervivencia sin progresión (SSP).

La presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo y/o la presencia de un nivel de expresión de HER1 alto pueden ser factores pronósticos de una duración mayor de la SSP.

5 La presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo en combinación con la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo y/o un nivel de expresión de HER1 alto, puede ser un factor pronóstico de una duración mayor de la SSP en comparación con el nivel de expresión de VEGFR2, c-KIT o HER1 solos.

La célula tumoral puede haber estado en contacto con el fármaco antineoplásico antes de la etapa (a) in vitro.

10 El nivel de expresión de VEGFR2 se puede determinar por la detección de los niveles de proteína total de VEGFR2, o el nivel de expresión de VEGFR2 se determina con un ensayo de detección dual de proximidad, ensayo de detección dual de proximidad que, opcionalmente, es un inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER).

15 El nivel de expresión de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R se puede determinar por la detección de los niveles de proteína total de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R, o el nivel de expresión de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R se determina con un ensayo de detección dual de proximidad, ensayo de detección dual de proximidad que, opcionalmente, es un inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER).

20 Otros aspectos características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la técnica a partir de la descripción detallada y las figuras siguientes.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra los diseños de matriz de formatos de portaobjetos ejemplares para analizar los niveles de HER1 y HER2 totales y fosforiladas.

30 La figura 2 muestra un esquema de un ensayo de proximidad ejemplar para detectar HER1 fosforilada. GO, glucosa oxidasa; HRP, peroxidasa de rábano picante.

35 La figura 3 muestra un esquema del inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER), también conocido como el inmunoensayo colaborativo de proximidad (COPIA). Cuando las proteínas objetivo se unen a anticuerpos de captura específicos impresos sobre una superficie de nitrocelulosa después de una incubación con lisado celular, se eliminan del portaobjetos las proteínas que no son objetivo y no están unidas. Uno de los anticuerpos detectores contra epítomos alternos en proteínas objetivo capturadas está conjugado con GO. La unión de otros anticuerpos detectores específicos para sitios fosforilados de la proteína objetivo (P) u otro epítomo no solapante (p) con jugado con HRP completa la formación del inmunocomplejo necesario para la generación de señales y la posterior amplificación de señales mediada por tiramida a través de la canalización de la enzima GO-HRP en presencia de glucosa. Se seleccionaron anticuerpos de captura y detección para reducir al mínimo la competición entre ellos (es decir, todos los anticuerpos se pueden unir simultáneamente a su epítomo correspondiente en la proteína de transducción de señales).

45 La figura 4 muestra curvas de valoración generadas a partir de CEER para ERBB2-T y ERBB2-P. Estos valores se usan como patrones para generar valores cuantitativos para muestras clínicas.

50 La figura 5 muestra la determinación de t-ERBB2 en células BT474. Se realizó el ensayo CEER de ERBB2 usando lisados celulares preparados a partir de células BT474. Se determinó el ensayo de p185-ERBB2 de longitud completa a partir de lisados que contenían ~25 células BT474 y se determinó el nivel de t-ERBB2 por el análisis de lisados celulares preparados a partir de ~250 células BT474 después de la eliminación inmunomagnética de p185-ERBB2.

55 La figura 6 muestra la expresión y la fosforilación de t-ERBB2 en tumores de pacientes. ERBB2, t-ERBB2, t-ERBB2 fosforilada. Se indica la configuración de la matriz. El CEER no solo permite la diferenciación de la expresión de ERBB2 de longitud completa frente a la trunca en muestras clínicas, sino que también proporciona información valiosa sobre el grado de fosforilación de manera cuantitativa.

60 La figura 7 muestra una IP-transferencia de bandas Western para ERBB2 para muestras clínicas. Se usaron anticuerpos anti-ICD-ERBB2 para inmunoprecipitar receptores de ERBB2 y después se realizó un análisis de transferencia de bandas Western usando unos segundos anticuerpos anti-ICD-ERBB2 para diferenciar la t-ERBB2 de longitud completa de la p185-ERBB2 de longitud completa.

La figura 8 muestra que en 174 muestras de cáncer de mama se observó la expresión y la activación de proteínas de una amplia variedad de rutas.

La figura 9 muestra un ejemplo de identificación funcional de rutas por CEER en una muestra de cáncer de mama triple negativo obtenida por biopsia por punción con aguja gruesa en comparación con células de cáncer de mama T47D de control y células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC).

5 La figura 10 muestra los resultados de una comparación entre la supervivencia sin progresión (SSP) de los grupos de muestras altas y bajas para cada marcador.

La figura 11 muestra los resultados de otra comparación entre la SSP de los grupos de muestras altas y bajas para cada marcador.

10 La figura 12 muestra que medir los niveles de expresión tanto de c-KIT como de VEGFR2 aumenta el valor pronóstico de la determinación de la respuesta al tratamiento triple en el CMTNM.

15 La figura 13 muestra que medir los niveles de expresión tanto de VEGFR2 como de HER1 aumenta el valor pronóstico de la determinación de la respuesta al tratamiento triple en el CMTNM.

La figura 14 muestra la correlación entre el aumento de los niveles de (A) VEGFR2 total, (B) c-KIT total y (C) HER1 total y la respuesta al tratamiento triple.

20 Descripción detallada de la invención

I. Introducción

25 Como se describe anteriormente, la activación de rutas de transducción de señales que están implicadas en la proliferación celular y la desactivación de rutas que están implicadas en la muerte celular son ejemplos no limitantes de características moleculares que caracterizan muchos tipos de cáncer diferentes. En muchos casos, la actividad de rutas de transducción de señales en particular y componentes de las mismas puede servir como distintivo molecular para un tipo de cáncer dado. Estos componentes activados pueden proporcionar además objetivos útiles para la intervención terapéutica. En consecuencia, el conocimiento del nivel de actividad de un sistema de transducción de señales en particular en una célula cancerosa antes, durante y después del tratamiento proporciona al facultativo información muy importante que se puede usar para seleccionar un tratamiento que es apropiado adoptar. Además, el seguimiento continuado de las rutas de transducción de señales que están activas en las células cancerosas a medida que avanza el tratamiento puede proporcionar al facultativo información adicional sobre la eficacia del tratamiento, lo que llevará al facultativo a continuar con un tratamiento en particular o a cambiar a otra línea de tratamiento, cuando, por ejemplo, las células cancerosas se hayan hecho resistentes al tratamiento a través de anomalías adicionales que activen la misma u otra ruta de transducción de señales.

40 En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento para predecir la respuesta de un tumor de mama triple negativo frente al tratamiento con un fármaco antineoplásico, procedimiento que comprende:

(a) lisar una célula tumoral obtenida a partir del tumor de mama triple negativo para producir un extracto celular;

(b) determinar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular; y

45 (c) comparar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular determinado en la etapa (b) con un nivel de expresión de VEGFR2 de referencia,

50 en el que la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico, en el que el fármaco antineoplásico es una combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel.

55 En determinados modos de realización, la capacidad de detectar e identificar células tumorales en la circulación a través de la determinación de la actividad de las rutas de transducción de señales en las células individuales es una ventaja importante de la presente invención. Con frecuencia, se encuentran células tumorales en la sangre de pacientes con diversos estadios iniciales de cáncer como "micrometástasis" (células tumorales diseminadas) y también se encuentran en cánceres metastásicos. El número de células tumorales en la sangre dependerá del estadio y el tipo de tumor. Aunque típicamente se obtienen biopsias de tumores primarios, la mayoría de los tumores metastásicos no se someten a biopsia, lo que dificulta enormemente el análisis molecular de las muestras de estos tumores. Durante la metástasis tumoral, las células tumorales más agresivas abandonan el tumor primario y se desplazan por la sangre y el sistema linfático hasta alcanzar una ubicación alejada. Por tanto, las células tumorales circulantes de la sangre representan la población de células tumorales más agresiva y homogénea. Sin embargo, el número de células tumorales metastásicas en la sangre suele ser muy bajo; varía desde uno a varios miles de células por mililitro de sangre. La capacidad de aislar y someter a ensayo rutas de transducción de señales en este tipo de células tan poco comunes y de aplicar esta información para tratamientos contra el cáncer más eficaces es un objetivo de la presente invención.

En modos de realización en particular, los inmunoensayos múltiples de alto rendimiento de la presente invención (p. ej., el inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER), también conocido como el inmunoensayo colaborativo de proximidad (COPIA)) pueden detectar el nivel de expresión y/o el grado de activación de una o más moléculas de transducción de señales en células obtenidas a partir de tejido tumoral (p. ej., muestras de BAAF) o en células circulantes de un tumor sólido en una célula individual. De hecho, se pueden detectar moléculas de transducción de señales tales como EGFR con una sensibilidad de aproximadamente 100 zeptomoles y un intervalo lineal dinámico de desde aproximadamente 100 zeptomoles hasta aproximadamente 100 femtomoles. Como tal, la detección en células individuales del nivel de expresión y/o el grado de activación de uno o varios transductores de señales en células tumorales facilita el pronóstico y el diagnóstico del cáncer, así como el diseño de tratamientos dirigidos personalizados.

Con respecto al cáncer de mama, las opciones actuales de pruebas no son satisfactorias, porque el tratamiento de tumores tanto primarios como metastásicos en un paciente con cáncer de mama se basa en un diagnóstico de una vez a partir de una pieza de tomada durante un estadio temprano de la enfermedad. En particular, la intervención terapéutica para los estadios tempranos como para los metastásicos del cáncer de mama se basa únicamente en el diagnóstico inicial a partir de la pieza de biopsia tomada durante un estadio temprano de la enfermedad debido a la imposibilidad de obtener una pieza de biopsia a partir de un paciente con cáncer metastásico. Sin embargo, los tumores de mama están evolucionando con el tiempo y los tratamientos, de tal modo que ese seguimiento temporal de los tumores de mama es esencial para prestar una atención óptima a los pacientes con cáncer de mama. Por ejemplo, un cambio en el estado de activación de uno o más de los receptores tirosina cinasa de la familia ErbB (HER) puede afectar a la selección del tratamiento en recidiva. Es más, es común la discordancia en el estado de HER-2 entre el cáncer primario y metastásico, ya que hasta el 37 % de todos los pacientes con cáncer de mama cambian de un tumor primario negativo para HER-2 a un cáncer metastásico positivo para HER-2. Además, los pacientes pueden presentar resistencia *de novo* o desarrollar resistencia adquirida al tratamiento hormonal debido a la activación de HER-1 y/o HER-2. En algunos casos, los pacientes pueden presentar resistencia *de novo* o desarrollar resistencia adquirida a tratamientos dirigidos a ErbB debido a la presencia de células tumorales que expresan p95HER-2. Como consecuencia, existe una necesidad clínica insatisfecha de proporcionar ensayos que ayuden al clínico a prescribir el tratamiento contra el cáncer adecuado en el momento adecuado, porque la tecnología actual carece de sensibilidad y especificidad, no se puede usar para realizar un seguimiento de los pacientes en tratamiento y no utiliza la identificación de rutas para orientar las decisiones de tratamiento individualizadas.

En contraste con las opciones de pruebas para el cáncer de mama disponibles actualmente, los procedimientos de la presente invención permite realizar un seguimiento de los pacientes con cáncer de mama en todos los estadios de la enfermedad al proporcionar una "biopsia en tiempo real" de tumores sólidas de mama con el uso de muestras tales como aspiración con aguja fina (AAF) a partir del tumor y/o células tumorales circulantes (CTC) de la sangre. Como ejemplo no limitante, los ensayos de cáncer de mama descritos en el presente documento se pueden usar en el diagnóstico inicial del cáncer de mama en un paciente e un estadio temprano de la enfermedad. La selección de un tipo de tratamiento adecuado contra el cáncer se guía por la identificación del nivel de expresión y/o el grado de activación de una o más rutas de señalización específicas con o sin fármacos antineoplásicos usando los ensayos de detección sencilla y de detección dual de proximidad (p. ej., CEER) descritos en el presente documento. De forma ventajosa, los procedimientos de la presente invención también se pueden usar para realizar un seguimiento de la progresión y/o la regresión de la enfermedad, ya que la intervención terapéutica puede estar basada en muestras tomadas en cualquier estadio de la enfermedad y analizadas usando los ensayos de detección sencilla y de detección dual de proximidad (p. ej., CEER) descritos en el presente documento. Como tal, la predicción, la identificación y/o la selección de tratamientos adecuados contra el cáncer para los estadios tempranos y metastásicos del cáncer de mama se guía por el diagnóstico en tiempo real y un análisis del estado de expresión y/o activación de moléculas de rutas de señalización específicas.

Los procedimientos de la presente invención se adaptan de forma beneficiosa para ocuparse de los puntos clave del abordaje del cáncer y proporcionar un nivel de atención mejor para pacientes con cáncer de mama (p. ej., pacientes con cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNM)) porque: (1) proporcionan una sensibilidad aumentada (p. ej., se puede lograr la detección de células individuales para detectar las moléculas de transducción de señales totales y/o fosforiladas tales como HER1 (EGFR), VEGFR2 y/o c-KIT); (2) proporcionan una especificidad aumentada (p. ej., los ensayos de proximidad de tres anticuerpos potencian la especificidad para detectar las moléculas de transducción de señales totales y/o fosforiladas); (3) permiten la identificación de rutas (p. ej., se puede detectar el estado de expresión y/o activación de una o más moléculas de transducción de señales específicas en AAF o CTC de pacientes); y (4) eliminan los problemas de la obtención de muestras de los pacientes (p. ej., se pueden realizar ensayos en una pocas células tumorales). Si bien en los ensayos novedosos descritos en el presente documento se puede usar cualquier muestra, las CTC son particularmente útiles porque representan las células tumorales más agresivas, se sabe que todos los tumores liberan CTC, pueden ser la única fuente de tumores residuales o de tumores metastásicos de difícil acceso y se encuentran en la sangre. Así, en determinados modos de realización, los procedimientos de la presente invención permiten el muestreo en serie de tejidos tumorales de mama, lo que da lugar a información valiosa sobre los cambios que se producen en las células tumorales con el tiempo y los tratamientos y proporciona a los clínicos un medio para realizar un seguimiento de distintivos de rutas de cáncer de rápida evolución.

En suma, de forma ventajosa, los procedimientos de la presente invención permiten una selección y un seguimiento precisos de pacientes con cáncer (p. ej., pacientes con CMTNM) con más probabilidad de beneficiarse de tratamientos dirigidos al realizar la identificación de rutas en células tumorales usando ensayos múltiples a base de anticuerpos de detección sencilla o de proximidad.

II. Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, los términos siguientes tienen los significados que se les atribuyen, a menos que se especifique lo contrario.

Se pretende que el término "cáncer" incluya cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por la proliferación incontrolada de células anómalas. El término incluye todos los cánceres y afecciones neoplásicas conocidas, caracterizados como malignos, benignos, de tejidos blandos o sólidos, y cánceres de todos los estadios y grados, incluidos cánceres pre- y posmetastásicos. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama; cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón no microcítico); cánceres digestivos y gastrointestinales tales como el cáncer colorrectal, los tumores estromales gastrointestinales, los tumores carcinoides gastrointestinales, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer anal, el cáncer de las vías biliares, el cáncer de intestino delgado y el cáncer de estómago (gástrico); cáncer esofágico; cáncer de vesícula biliar; cáncer de hígado, cáncer pancreático; cáncer de apéndice; cáncer ovárico; cáncer renal (p. ej., carcinoma de células renales); cáncer del sistema nervioso central; cáncer de piel; linfomas; coriocarcinomas; cánceres de la cabeza y el cuello; sarcomas osteógenos; y cánceres sanguíneos. Tal como se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas. En la invención, el tumor es un tumor de mama triple negativo. En un modo de realización preferente, el tumor de mama se obtiene a partir de un sujeto con una forma invasiva o localizada de carcinoma ductal o carcinoma lobular. En otro modo de realización preferente, el tumor de mama se obtiene a partir de un sujeto con cáncer de mama metastásico o en recidiva.

El término "analito" incluye cualquier molécula de interés, típicamente una macromolécula tal como un polipéptido, de la cual se determina su presencia, cantidad (nivel de expresión), estado de activación y/o identidad. En determinados casos, el analito es una molécula de transducción de señales tal como, p. ej., HER1 (EGFR), VEGFR2 o c-KIT.

El término "molécula de transducción de señales" o "transductor de señales" incluye proteínas y otras moléculas que llevan a cabo el proceso por el que una célula convierte una señal o un estímulo extracelular en una respuesta que, típicamente, conlleva secuencias ordenadas de reacciones bioquímicas dentro de la célula. Los ejemplos de moléculas de transducción de señales incluyen, pero sin limitación, tirosina cinasas receptoras tales como EGFR (p. ej., EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1/KDR, VEGFR3/FLT4, FLT3/FLK2, PDGFR (p. ej., PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (receptor relacionado con el receptor de insulina), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, c-MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3 TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-cadherina, LTK (tirosina cinasa de leucocitos), ALK (cinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3 y RTK 106; formas truncadas de tirosina cinasas receptoras tales como receptores HER2 truncados que carecen de dominios aminoterminales extracelulares (p. ej., p95ErbB2 (p95m), p 110, p95c, p95n, etc.); dímeros de tirosina cinasas receptoras (p. ej., p95HER2/HER3, p95HER2/HER2, HER2/HER2, HER2/HER3, HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, etc.); tirosina cinasas que no son receptoras, tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK; componentes tirosina cinasa de cascadas de señalización tales como AKT (p. ej., AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (p. ej., PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), SGK3, 4E-BP1, P70S6K (p. ej., variante de ajuste alfa I de la cinasa p70 S6), tirosina fosfatasas de proteínas (p. ej., PTP1B, PTPN13, BDP 1, etc.), RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc (p66), Ras (p. ej., K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, GSK-3 β , RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 y paxilina; receptores nucleares de hormonas tales como el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor de andrógenos, el receptor de glucocorticoides, el receptor de mineralocorticoides, el receptor de vitamina A, el receptor de vitamina D, el receptor retinoide, el receptor de hormonas tiroideas y receptores huérfanos; coactivadores y represores de receptores nucleares tales como el amplificado en cáncer de mama-1 (AIB1) y el correpresor de receptor nuclear 1 (NCOR), respectivamente; y combinaciones de los mismos.

El término "estado de activación" se refiere a si una molécula de transducción de señales en particular está activada o no. De forma similar, el término "grado de activación" se refiere a en qué medida está activada una molécula de transducción de señales en particular. Típicamente, el estado o el grado de activación corresponde al estado o grado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejos de una o más (p. ej., una pluralidad de) moléculas de transducción de señales. Los ejemplos no limitantes de estados de activación (enumerados entre paréntesis) incluyen: HER1/EGFR (EGFRvIII, EGFR fosforilada (p-), EGFR:Shc, EGFR ubiquitinada (u-), p-EGFRvIII); ErbB2 (p-ErbB2, p95HER2 (ErbB2 truncada), p-p95HER2, ErbB2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); c-MET (p-c-

MET, complejo c-Met:HGF); AKT1 (p-AKT1); AKT2 (p-AKT2); AKT3 (p-AKT3); PTEN (p-PTEN); P70S6K (p-P70S6K); MEK (p-MEK); ERK1 (p-ERK1); ERK2 (p-ERK2); PDK1 (p-PDK1); PDK2 (p-PDK2); SGK3 (p-SGK3); 4E-BP1 (p-4E-BP1); PIK3R1 (p-PIK3R1); c-KIT (p-c-KIT); ER (p-ER); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRA (p-PDGFRA); PDGFRB (p-PDGFRB); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLC γ , VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLC γ , VEGFR2:Src, VEGFR2:sulfato de heparina, VEGFR2:VE-cadherina); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); TIE1 (p-TIE1); TIE2 (p-TIE2); EPHA (p-EPHA); EPHB (p-EPHB); GSK-3 β (p-GSK-3 β); NF κ B (p-NF κ B); IKK (p-IKK, p-P65:IKK); BAD (p-BAD, BAD:14-3-3); mTOR (p-mTOR); Rsk-1 (p-Rsk-1); Jnk (p-Jnk); P38 (p-P38); STAT1 (p-STAT1); STAT3 (p-STAT3); FAK (p-FAK); RB (p-RB); Ki67; p53 (p-p53); CREB (p-CREB); c-Jun (p-c-Jun); c-Src (p-c-Src); paxilina (p-paxilina); GRB2 (p-GRB2), Shc (p-Shc), Ras (p-Ras), GAB1 (p-GAB1), SHP2 (p-SHP2), GRB2 (p-GRB2), CRKL (p-CRKL), PLC γ (p-PLC γ), PKC (p. ej., p-PKC α , p-PKC β , p-PKC δ), aducina (p-aducina), RB1 (p-RB1) y PYK2 (p-PYK2).

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "serie de dilución" incluya una serie de concentraciones descendentes de una muestra (p. ej., un lisado celular) o reactivo (p. ej., un anticuerpo) en particular. Típicamente, una serie de dilución se produce por un procedimiento de mezcla de una cantidad medida de una concentración de partida de una muestra o un reactivo con un diluyente (p. ej., un tampón de dilución) para crear una concentración más baja de la muestra o el reactivo y repetir el procedimiento las veces suficientes para obtener el número deseado de diluciones seriadas. La muestra o el reactivo se pueden diluir en serie al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 o 1000 veces para producir una serie de dilución que comprenda al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 concentraciones descendentes de la muestra o el reactivo. Por ejemplo, se puede producir una serie de dilución que comprenda una dilución seriada de 2 veces de un reactivos de anticuerpo de captura a una concentración de partida de 1 mg/ml mezclando una cantidad de la concentración de partida del anticuerpo de captura con una cantidad igual de un tampón de dilución para crear una concentración de 0,5 mg/ml del anticuerpo de captura y repetir el procedimiento para obtener concentraciones de anticuerpo de captura de 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,0325 mg/ml, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término "intervalo dinámico superior" se refiere a la capacidad de un ensayo de detectar un analito específico en tan solo una célula o en hasta miles de células. Por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento poseen un intervalo dinámico superior porque, de forma ventajosa, detectan una molécula de transducción de señales de interés en particular en aproximadamente 1-10.000 células (p. ej., en aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 o 10.000 células) usando una serie de dilución de concentraciones de anticuerpo de captura.

Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" incluye cualquier espécimen biológico obtenido a partir de un paciente. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre entera, plasma, suero, eritrocitos, leucocitos (p. ej., células mononucleares de sangre periférica), fluido de lavado ductal, aspirado de pezón, linfa (p. ej., células tumorales del ganglio linfático diseminadas), aspirado de médula ósea, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), esputos, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado con aguja fina (p. ej., recogidos por aspiración periareolar aleatoria con aguja fina), cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido (p. ej., tejido tumoral) tal como una pieza de biopsia de un tumor (p. ej., una biopsia por punción) o un ganglio linfático (p. ej., una biopsia de ganglio linfático centinela), una muestra de tejido (p. ej., tejido tumoral) tal como la extirpación quirúrgica de un tumor, y extractos celulares de las mismas. En algunos modos de realización, la muestra es sangre entera o un componente fraccionado de la misma, tal como plasma, suero o un sedimento celular. En determinados casos, la muestra se obtiene aislando células circulantes de un tumor sólido a partir de sangre entera o una fracción celular de la misma con cualquier técnica conocida en la técnica. En otros modos de realización, la muestra es una muestra de tejido tumoral fijada con formol e incluida en parafina (FFIP), p. ej., de un tumor sólido de la mama.

Una "biopsia" se refiere al procedimiento de retirar una muestra de tejido para su evaluación pronóstica o diagnóstica, y al propio espécimen de tejido. A los procedimientos y las composiciones de la presente invención se les puede aplicar cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica. En general, la técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido que se va a evaluar y del tamaño y el tipo del tumor (es decir, sólido o en suspensión (es decir, en la sangre o en ascitis)), entre otros factores. La técnicas de biopsia representativas incluyen la biopsia por escisión, la biopsia por incisión, la biopsia por punción (p. ej., biopsia con aguja gruesa, biopsia por aspiración con aguja fina, etc.), biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Se analizan técnicas de biopsia, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16^a ed., 2005, capítulo 70, y a lo largo de la parte V. Un experto en la técnica apreciará que se pueden realizar técnicas de biopsia para identificar células cancerosas y/o precancerosas en una muestra de tejido dada.

Tal como se usa en el presente documento, el término "células circulantes" comprende células extratumorales que se han metastatizado o micrometastatizado a partir de un tumor sólido. Los ejemplos de células circulantes incluyen, pero sin limitación, células tumorales circulantes, células madre cancerosas y/o células que migran hacia el tumor (p. ej., células endoteliales progenitoras circulantes, células endoteliales circulantes, células mielocíticas proangiogénicas circulantes, células dendríticas circulantes, etc.). Se pueden obtener muestras de pacientes que contienen células circulantes a partir de cualquier fluido biológico accesible (p. ej., sangre entera, suero, plasma,

esputos, fluido de lavado bronquial, orina, aspirado de pezón, linfa, saliva, aspiración con aguja fina, etc.). En determinados casos, se separa la muestra de sangre entera en una fracción de plasma o suero y una celular (es decir, un sedimento celular). Típicamente, la fracción celular contiene eritrocitos, leucocitos y/o células circulantes de un tumor sólido tales como células tumorales circulantes (CTC), células endoteliales circulantes (CEC), células endoteliales progenitoras circulantes (CEPC), células madre cancerosas (CMC), células tumorales del ganglio linfático diseminadas y combinaciones de las mismas. Habitualmente, la fracción de plasma o suero contiene, entre otras cosas, ácidos nucleicos (p. ej., ADN, ARN) y proteínas que liberan las células circulantes de un tumor sólido.

Típicamente, las células circulantes se aíslan a partir de una muestra de un paciente usando uno o más procedimientos de separación, incluidos, por ejemplo, la separación inmunomagnética (véanse, p. ej., Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577-582 (2001)), el sistema CellTracks® de Immunicon (Huntingdon Valley, PA), la separación microfluídica (veánse, p. ej., Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin et al., resumen N° 5147, 97ª reunión anual de la AACR, Washington, D.C. (2006)), FACS (véase, p. ej., Mancuso et al., Blood, 97:3658-3661 (2001)), la centrifugación en gradiente de densidad (véase, p. ej., Baker et al., Clin. Cancer Res., 13:4865-4871 (2003)) y procedimientos de depleción (véase, p. ej., Meye et al., Int. J. Oncol., 21:521-530 (2002)).

Típicamente, las moléculas de transducción de señales de interés se extraen poco tiempo después de aislar las células circulantes para conservar su estado de activación *in situ*, preferentemente en un plazo de aproximadamente 24, 6 o 1 h, y más preferentemente en un plazo de aproximadamente 30, 15 o 5 minutos. También se pueden incubar las células aisladas con uno o más factores de crecimiento, habitualmente a concentraciones de nanomolar a micromolar, durante aproximadamente 1-30 minutos para reanimar o estimular la activación de las moléculas de transducción de señales (véase, p. ej., Irish et al., Cell, 118:217-228 (2004)). Por ejemplo, para evaluar posibles tratamientos antineoplásicos para un paciente individual, se pueden incubar las células aisladas con uno o más fármacos antineoplásicos a dosis variables. Después, se puede realizar una estimulación con factores de crecimiento durante unos minutos (p. ej., aproximadamente 1-5 minutos) o durante varias horas (p. ej., aproximadamente 1-6 horas). La activación diferencial de las rutas de señalización con y sin fármacos antineoplásicos puede ayudar en la selección de un tratamiento adecuado contra el cáncer a la dosis correcta para cada paciente individual. También se pueden aislar células circulantes a partir de una muestra de un paciente durante el tratamiento con fármacos antineoplásicos y estimularlas con uno o más factores de crecimiento para determinar si se debería aplicar un cambio en el tratamiento o no.

Típicamente, el término "sujeto" o "paciente" o "individuo" incluye seres humanos, pero también puede incluir otros animales tales como, p. ej., otros primates, roedores, cánidos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

Una "matriz" o "micromatriz" comprende un conjunto y/o una serie de dilución independiente de anticuerpos de captura inmovilizados o restringidos sobre un soporte sólido tal como, por ejemplo, vidrio (p. ej., un portaobjetos de vidrio), plástico, chips, clavijas, filtros, perlas (p. ej., perlas magnéticas, perlas de poliestireno, etc.), papel, membranas (p. ej., nailon, nitrocelulosa, poli(fluoruro de vinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. En general, los anticuerpos de captura se inmovilizan o restringen sobre el soporte sólido por medio de interacciones covalentes o no covalentes (p. ej., enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En determinados casos, los anticuerpos de captura comprenden marcas de captura que interaccionan con agentes de captura unidos al soporte sólido. Típicamente, las matrices usadas en los ensayos descritos en el presente documento comprenden una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes y/o concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en diferentes ubicaciones conocidas/dirigibles.

Se pretende que el término "anticuerpo de captura" incluya un anticuerpo inmovilizado que es específico para (es decir, une, se une a, o forma un complejo con) uno o más analitos de interés de una muestra tal como un extracto celular. En modos de realización en particular, el anticuerpo de captura se restringe sobre un soporte sólido en una matriz. Existen anticuerpos de captura adecuados para inmovilizar cualquiera de una variedad de moléculas de transducción de señales sobre un soporte sólido disponibles de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA).

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo de detección" incluye un anticuerpo que comprende una marca detectable que es específico para (es decir, une, se une a, o forma un complejo con) uno o más analitos de interés de una muestra. El término también engloba un anticuerpo que es específico para uno o más analitos de interés, en el que el anticuerpo se puede unir a otra especie que comprenda una marca detectable. Los ejemplos de marcas detectables incluyen, pero sin limitación, marcas de biotina/estreptavidina, marcas de ácido nucleico (p. ej., oligonucleótidos), marcas químicamente reactivas, marcas fluorescentes, marcas enzimáticas, marcas radioactivas y combinaciones de las mismas. Existen anticuerpos de detección adecuados para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de cualquiera de una variedad de moléculas de transducción de señales disponibles de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA). Como ejemplo no limitante, existen anticuerpos fosfoespecíficos

contra las formas fosforiladas de moléculas de transducción de señales tales como EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, AKT, MAPK, PTEN, Raf y MEK disponibles de Santa Cruz Biotechnology.

5 El término "anticuerpo dependiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico para (es decir, une, se une a, o forma un complejo con) un estado de activación en particular de uno o más analitos de interés de una muestra. En modos de realización preferentes, el anticuerpo dependiente del estado de activación detecta el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejos de uno o más analitos, tales como una o más moléculas de transducción de señales. En algunos modos de realización, se detecta la fosforilación de miembros de la familia EGFR de tirosina cinasas receptoras y/o la formación de complejos heterodiméricos entre miembros de la familia EGFR usando anticuerpos dependientes del estado de activación. En modos de realización en particular, los anticuerpos dependientes del estado de activación son útiles para detectar uno o más sitios de fosforilación en una o más de las siguientes moléculas de transducción de señales (los sitios de fosforilación corresponden a la posición del aminoácido en la secuencia de la proteína humana): EGFR/HER1/ErbB1 (p. ej., tirosina (Y) 1068); ErbB2/HER2 (p. ej., Y1248); ErbB3/HER3 (p. ej., Y1289); ErbB4/HER4 (p. ej., Y1284); c-Met (p. ej., Y1003, Y1230, Y1234, Y1235 y/o Y1349); SGK3 (p. ej., treonina (T) 256 y/o serina (S) 422); 4E-BP1 (p. ej., T70); ERK1 (p. ej., T185, Y187, T202 y/o Y204); ERK2 (p. ej., T185, Y187, T202 y/o Y204); MEK (p. ej., S217 y/o S221); PIK3R1 (p. ej., Y688); PDK1 (p. ej., S241); P70S6K (p. ej., T229, T389 y/o S421); PTEN (p. ej., S380); AKT1 (p. ej., S473 y/o T308); AKT2 (p. ej., S474 y/o T309); AKT3 (p. ej., S472 y/o T305); GSK-3 β (p. ej., S9); NF κ B (p. ej., S536); I κ B (p. ej., S32); BAD (p. ej., S112 y/o S136); mTOR (p. ej., S2448); Rsk-1 (p. ej., T357 y/o S363); Jnk (p. ej., T183 y/o Y185); P38 (p. ej., T180 y/o Y182); STAT3 (p. ej., Y705 y/o S727); FAK (p. ej., Y397, Y576, S722, Y861 y/o S910); RB (p. ej., S249, T252, S612 y/o S780); RB1 (p. ej., S780); aducina (p. ej., S662 y/o S724); PYK2 (p. ej., Y402 y/o Y881); PKC α (p. ej., S657); PKC α/β (p. ej., T368 y/o T641); PKC δ (p. ej., T505); p53 (p. ej., S392 y/o S20); CREB (p. ej., S133); c-Jun (p. ej., S63); c-Src (p. ej., Y416); y paxilina (p. ej., Y31 y/o Y118).

25 El término "anticuerpo independiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico para (es decir, une, se une a, o forma un complejo con) uno o más analitos de interés de una muestra, independientemente de su estado de activación. Por ejemplo, el anticuerpo independiente del estado de activación puede detectar formas tanto fosforiladas como no fosforiladas de uno o más analitos tales como una o más moléculas de transducción de señales.

30 El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" incluye desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya sea en forma mono- o bicatenaria, tales como por ejemplo, ADN y ARN. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o enlaces o residuos estructurales modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales y que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de estos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (ANP). A menos que se limite específicamente, el término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. A menos que se indique lo contrario, la secuencia de un ácido nucleico en particular también engloba de implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente.

40 El término "oligonucleótido" incluye un oligómero o polímero monocatenario de ARN, ADN, híbrido de ARN/ADN y/o un mimético de los mismos. En determinados casos, los oligonucleótidos se componen de nucleobases, azúcares y enlaces entre nucleósidos (estructurales) naturales (es decir, no modificados. En otros casos determinados, los oligonucleótidos comprenden nucleobases, azúcares y/o enlaces entre nucleósidos modificados.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "motivo no coincidente" o "región no coincidente" se refiere a una parte de un oligonucleótido que no tiene una complementariedad del 100 % con su secuencia complementaria. Un oligonucleótido puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones no coincidentes. Las regiones no coincidentes pueden ser contiguas o pueden estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más nucleótidos. Los motivos o las regiones no coincidentes pueden comprender un solo nucleótido o pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o más nucleótidos.

55 La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a las condiciones en las que un oligonucleótido hibridará con su secuencia complementaria, pero con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Se puede encontrar una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, se seleccionan condiciones rigurosas aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias al objetivo hibridan con la secuencia objetivo en el equilibrio (como las secuencias objetivo están presentes en exceso, a la T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en el equilibrio). También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo.

Los términos "sustancialmente idéntico/a" o "identidad sustancial", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales (es decir, al menos aproximadamente el 60 %, preferentemente al menos aproximadamente el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de identidad en una región específica) comparadas y alineadas para que la correspondencia sea máxima en una ventana de comparación o una región indicada, medido usando un algoritmo de comparación de secuencias o por alineación manual e inspección visual. Esta definición, cuando lo indique el contexto, también se refiere de forma análoga al complemento de una secuencia. Preferentemente, la identidad sustancial existe en una región que tiene al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos de longitud.

El término "incubar" se usa como sinónimo de "poner en contacto" y "exponer" y no implica ningún requisito de tiempo o temperatura específico, a menos que se indique lo contrario.

Las "tirosina cinasas receptoras" o "RTK" incluyen una familia de cincuenta y seis (56) proteínas caracterizadas por un dominio transmembranario y un motivo tirosina cinasa. Las RTK realizan su función en la señalización celular y transmiten señales que regulan la proliferación, la diferenciación, la adhesión, la migración y la apoptosis. La activación y/o la sobreexpresión por mutación de las tirosina cinasas receptoras transforma las células y es frecuente que desempeñe un papel fundamental en la aparición de cánceres. Las RTK se han convertido en objetivo de diversos agentes dirigidos molecularmente tales como el trastuzumab, el cetuximab, el gefitinib, el erlotinib, el sunitinib, el imatinib, el nilotinib y similares. Una ruta de transducción de señales bien caracterizada es la ruta de las MAP cinasas, que es responsable de transducir la señal desde el factor de crecimiento epidérmico (EGF) hasta la promoción de la proliferación celular en las células.

El término "supervivencia sin progresión" o "SSP" incluye el periodo de tiempo durante y después del tratamiento de una enfermedad (p. ej., cáncer) en el que un paciente vive con la enfermedad sin síntomas de la enfermedad adicionales.

En el contexto de la presente invención, el término "triple negativo" incluye una célula tumoral (p. ej., una célula tumoral circulante), un tumor o un cáncer tal como un cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNM) en los que no se observa una expresión detectable del receptor de estrógenos (ER), del receptor de progesterona (PR) o del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2).

III. Descripción de los modos de realización

La presente invención se refiere a un procedimiento para predecir la respuesta de un tumor de mama triple negativo frente al tratamiento con un fármaco antineoplásico, procedimiento que comprende:

- (a) lisar una célula tumoral obtenida a partir del tumor de mama triple negativo para producir un extracto celular;
 - (b) determinar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular; y
 - (c) comparar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular determinado en la etapa (b) con un nivel de expresión de VEGFR2 de referencia,
- en el que la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico, en el que el fármaco antineoplásico es una combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel.

En aspectos particulares, la presente invención proporciona el marcador molecular VEGFR2 y, opcionalmente, otros marcadores moleculares (biomarcadores) que permite, determinar o predecir si un cáncer en particular puede responder o no o si es probable que responda favorablemente o no a una combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel (p. ej., Abraxane® o nabP) ("tratamiento triple").

La presente invención se refiere a un procedimiento para predecir la respuesta de un tumor de mama triple negativo frente al tratamiento con un fármaco antineoplásico, procedimiento que comprende:

- (a) lisar una célula tumoral obtenida a partir del tumor de mama triple negativo para producir un extracto celular;
- (b) determinar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular; y
- (c) comparar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular determinado en la etapa (b) con un nivel de expresión de VEGFR2 de referencia,

en el que la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico, en el que el fármaco antineoplásico es una combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel.

5 La etapa (b) puede comprender además determinar el nivel de expresión de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R en el extracto celular. En el procedimiento de la invención, la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo, un nivel de expresión de HER1 alto y/o un nivel de expresión de IGF-1R bajo en el extracto celular en comparación con un nivel de expresión de c-KIT, HER1 o IGF-1R de referencia es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico. En algunos modos de realización, la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 de medio a alto, un nivel de expresión de c-KIT de medio a alto, un nivel de expresión de HER1 de bajo a medio y/o un nivel de expresión de IGF-1R de medio a alto en el extracto celular es un factor pronóstico de la ausencia de respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico. En un modo de realización en particular, el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión en el extracto celular de una combinación de analitos que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en VEGFR2 y c-KIT. En otro modo de realización en particular, el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión en el extracto celular de una combinación de analitos que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en VEGFR2 y HER1. En otro modo de realización adicional en particular, el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión en el extracto celular de una combinación de analitos que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en VEGFR2, c-KIT y HER1. En un modo de realización adicional en particular, el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión en el extracto celular de una combinación de analitos que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en VEGFR2, c-KIT, HER1 e IGF-1R. En determinados casos, el procedimiento de la presente invención comprende además determinar el grado de activación en el extracto celular de al menos uno, dos o más (p. ej., todos) de VEGFR2, c-KIT, HER1, IGF-1R y/o AKT. En otros casos, el procedimiento comprende además incubar la célula tumoral obtenida a partir del tumor de mama triple negativo con el fármaco antineoplásico antes de la etapa (a).

25 En otros modos de realización, la célula tumoral es una célula obtenida por aspiración con aguja fina (AAF) a partir de un tumor tal como un tumor de mama triple negativo o una célula tumoral circulante (CTC) obtenida a partir de una muestra de fluido corporal. Típicamente, la célula tumoral se aísla a partir de una muestra que incluye sangre entera, suero, plasma o tejido tumoral. En modos de realización en particular, la muestra se obtiene a partir de un sujeto con cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNM).

35 En algunos casos, la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo es un factor pronóstico de una duración mayor de la supervivencia sin progresión (SSP). En otros casos, la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo es un factor pronóstico de una duración mayor de la SSP. En casos adicionales, la presencia de un nivel de expresión de HER1 alto es un factor pronóstico de una duración mayor de la SSP. En otros casos más, la presencia de un nivel de expresión de IGF-1 bajo es un factor pronóstico de una duración mayor de la SSP. En casos particulares, la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo en combinación con la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo y/o un nivel de expresión de HER1 alto, es un factor pronóstico de una duración mayor de la SSP en comparación con el nivel de expresión de VEGFR2, c-KIT o HER1 solos.

40 En determinados modos de realización, los procedimientos de la presente invención (p. ej., los procedimientos para determinar la sensibilidad de una célula de un tumor triple negativo frente al tratamiento con un fármaco antineoplásico y para predecir la respuesta de un tumor de mama triple negativo al tratamiento con un fármaco antineoplásico) pueden comprender además la etapa (d) de proporcionar el resultado de la comparación obtenido en la etapa (c) al usuario (p. ej., un clínico, tal como un oncólogo o un médico de cabecera) en un formato legible. En determinados modos de realización, los procedimientos de la presente invención pueden comprender además enviar o informar del resultado de la comparación obtenido en la etapa (c) a un clínico, p. ej., un oncólogo o un médico de cabecera. En otros casos, los procedimientos de la presente invención pueden comprender además registrar o almacenar el resultado de la comparación obtenido en la etapa (c) en una base de datos en un ordenador u otro aparato o dispositivo adecuado para almacenar información, p. ej., en un laboratorio.

55 En modos de realización en particular, se determina el nivel de expresión de VEGFR2, c-KIT, HER1 y/o IGF-1R detectando los niveles de proteína total de VEGFR2, c-KIT, HER1 y/o IGF-1R, p. ej., usando un inmunoensayo con anticuerpos específicos de analito. El estado y/o el nivel de expresión total se puede determinar usando cualquiera de una variedad de técnicas. Como ejemplos no limitantes, se puede determinar el nivel de expresión de VEGFR2, c-KIT, HER1 y/o IGF-1R con un ensayo de detección sencillo o con un ensayo de detección dual de proximidad, como se describe en el presente documento. En modos de realización preferentes, el ensayo de detección dual de proximidad es un inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER).

60 En algunos modos de realización, el nivel de expresión (p. ej., total) y/o el grado de activación (p. ej., fosforilación) de los uno o más analitos se expresa como un valor de unidad de fluorescencia relativa (UFR) que corresponde a la intensidad de la señal para un analito de interés en particular que se determina usando, p. ej., un CEER. En otros modos de realización, el nivel de referencia y/o el grado de activación de los uno o más analitos se cuantifica calibrando o normalizando el valor de UFR que se determina usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, frente a una curva de calibrado generada para el analito de interés en particular. En determinados casos, se puede calcular el valor de UFR con base en una curva de calibrado.

65

- En otros modos de realización, el nivel de expresión y/o el grado de activación de los uno o más analitos se expresa como "bajo", "medio" o "alto", que corresponde a la intensidad de la señal creciente para un analito de interés en particular que se determina usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER. En algunos casos, un nivel de expresión o grado de activación indetectable o mínimamente detectable de un analito de interés en particular que se determina usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, se puede expresar como "indetectable". En otros casos, un nivel de expresión o grado de activación bajo de un analito de interés en particular que se determina usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, se puede expresar como "bajo". En otros casos adicionales, un nivel de expresión o grado de activación moderado de un analito de interés en particular que se determina usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, se puede expresar como "medio". En otros casos adicionales más, un nivel de expresión o grado de activación alto de un analito de interés en particular que se determina usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, se puede expresar como "de medio a alto". En casos adicionales, un nivel de expresión o grado de activación muy alto de un analito de interés en particular que se determina usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, se puede expresar como "alto".
- En modos de realización en particular, el nivel de expresión y/o el grado de activación de un analito de interés en particular se calcula a partir de una o más curvas de calibrado generadas a partir de una muestra tal como, por ejemplo, una línea celular cancerosa. Como ejemplo no limitante, para cada ensayo usado para determinar el nivel de expresión o el grado de activación de un analito de interés en particular, se puede generar una curva sigmoidea a partir de una o varias (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, etc.) concentraciones de lisados celulares diluidos en serie preparados a partir de una línea celular cancerosa. En modos de realización preferentes, la línea celular cancerosa expresa uno o más analitos de interés, p. ej., VEGFR2, c-KIT, HER1 y/o IGF-1R. Se puede representar gráficamente cada curva como una función de la intensidad de la señal frente a unidades derivadas del logaritmo de la concentración y se puede calcular la UE (unidad estimada) con base en la curva de calibrado. El ejemplo 7 proporciona una descripción más detallada de la cuantificación del nivel de expresión y/o el grado de activación de un analito de interés en particular frente a una curva de calibrado generada para el analito de interés en particular.
- En determinados modos de realización, el nivel de expresión o el grado de activación de un analito de interés en particular, cuando se expresa como "bajo", "medio" o "alto", puede corresponder a un nivel de activación o grado de activación que es de al menos aproximadamente 0, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000 UFR o más, p. ej., cuando se compara con un nivel de expresión y/o grado de activación de referencia para ese analito de interés en particular en un control negativo (p. ej., un control de IgG), en una curva de calibrado generada para el analito de interés (p. ej., una curva de calibrado generada a partir de una línea celular cancerosa), en un control positivo tal como un control de pan-CK, en presencia de un fármaco antineoplásico y/o en ausencia de un fármaco antineoplásico. En algunos casos, la correlación es específica de analito. Como ejemplo no limitante, un nivel de expresión o grado de activación "bajo" determinado usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, puede corresponder a 10.000 RFU de expresión o activación para un analito y 50.000 RFU para otro analito cuando se compara con un nivel de expresión o grado de activación de referencia.
- En determinados modos de realización, el nivel de expresión o grado de activación de un analito de interés en particular puede corresponder a un nivel de expresión o grado de activación indicado como "bajo", "medio" o "alto" que es relativo a un nivel de expresión o grado de activación de referencia para ese analito de interés en particular, p. ej., cuando se compara con un control negativo tal como un control de IgG, cuando se compara con una curva de calibrado generada para el analito de interés (p. ej., una curva de calibrado generada a partir de una línea celular cancerosa), cuando se compara con un control positivo tal como un control de pan-CK, cuando se compara con un nivel de expresión o grado de activación determinado en presencia de un fármaco antineoplásico y/o cuando se compara con un nivel de expresión o grado de activación determinado en ausencia de un fármaco antineoplásico. En algunos casos, la correlación es específica de analito. Como ejemplo no limitante, un nivel de expresión o grado de activación "bajo" determinado usando, p. ej., un ensayo de proximidad tal como CEER, puede corresponder a un aumento de 2 veces de la expresión o la activación para un analito y a un aumento de 5 veces para otro analito cuando se compara con un nivel de expresión o grado de activación de referencia.
- En determinados modos de realización, el nivel de expresión o grado de activación de un analito de interés en particular puede corresponder a un nivel de activación o grado de activación que se compara con un nivel de expresión y/o grado de activación de referencia para ese analito de interés en particular en un control negativo (p. ej., un control de IgG), en una curva de calibrado generada para el analito de interés (p. ej., una curva de calibrado generada a partir de una línea celular cancerosa), en un control positivo tal como un control de pan-CK, en presencia de un fármaco antineoplásico y/o en ausencia de un fármaco antineoplásico.
- En determinados modos de realización, se considera que un nivel de expresión o grado de activación más alto de un analito de interés en particular está presente en una muestra (p. ej., un extracto celular) cuando el nivel de expresión o grado de activación es al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces más alto (p. ej., aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces más alto) que el nivel de expresión o grado de activación de referencia para ese analito de interés en particular en un control negativo (p. ej., un control de IgG), en una curva de calibrado generada para el analito de interés (p. ej., una curva de calibrado generada a partir de una

línea celular cancerosa), en un control positivo (p. ej., un control de pan-CK), en presencia de un fármaco antineoplásico y/o en ausencia de un fármaco antineoplásico.

En otros modos de realización, se considera que un nivel de expresión o grado de activación más bajo de un analito de interés en particular está presente en una muestra (p. ej., un extracto celular) cuando el nivel de expresión o grado de activación es al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces más bajo (p. ej., aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces más bajo) que el nivel de expresión o grado de activación de referencia para ese analito de interés en particular en un control negativo (p. ej., un control de IgG), en una curva de calibrado generada para el analito de interés (p. ej., una curva de calibrado generada a partir de una línea celular cancerosa), en un control positivo (p. ej., un control de pan-CK), en presencia de un fármaco antineoplásico y/o en ausencia de un fármaco antineoplásico.

En otros modos de realización, el nivel de expresión o grado de activación de referencia de un analito de interés en particular es un valor de corte. En algunos casos, el valor de corte incluye un número elegido sobre la base del análisis poblacional de un analito de interés en particular que se usa para su comparación con el nivel de expresión o grado de activación de ese analito en el extracto celular. Como ejemplo no limitante, se puede obtener un valor de corte al dividir el nivel de expresión o grado de activación de un analito de interés en particular de una población de individuos en los grupos "alto" y "bajo" y seleccionar el que esté en o próximo a la mediana del nivel de expresión o grado de activación de ese analito en la población. Se puede comparar el nivel de expresión o grado de activación del analito de interés en el extracto celular con el valor de corte y determinar que es un nivel de expresión o grado de activación "alto" y "bajo" con base en si el nivel de expresión o grado de activación del analito en el extracto celular está por encima (p. ej., "alto") o por debajo (p. ej., "bajo") del valor de corte. El ejemplo 5 proporciona un modo de realización ejemplar para calcular, seleccionar y usar valores de corte de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. En otros modos de realización, se puede obtener el valor de corte a partir de una curva de calibrado generada para un analito de interés en particular (p. ej., una curva de calibrado generada a partir de una línea celular cancerosa) y compararlo con el nivel de expresión o grado de activación de ese analito en el extracto celular. Los expertos en la técnica reconocerán que se puede determinar un valor de corte de acuerdo con las necesidades del usuario y las características de la población analizada.

En algunos aspectos divulgados, el fármaco antineoplásico comprende uno o más agentes que interfieren con la función de componentes de rutas de transducción de señales expresados y/o activados de forma anómala en células cancerosas. Los ejemplos no limitantes de agentes de este tipo incluyen los que se enumeran a continuación en la tabla 1 de la publicación PCT N° WO 2010/132723.

En determinados aspectos divulgados, el fármaco antineoplásico comprende un agente antiseñalización (es decir, un agente citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina cinasas; un agente antiproliferativo; un agente quimioterápico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente hormonoterápico; un agente radioterápico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular la proliferación descontrolada de células anómalas, tales como las células cancerosas. En algunos modos de realización, se tratan las células aisladas con uno o más agentes antiseñalización, agentes antiproliferativos y/o agentes hormonoterápicos en combinación con al menos un agente quimioterápico.

Los ejemplos de agentes antiseñalización incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales tales como trastuzumab (Herceptin®), pertuzumab (2C4), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), gemtuzumab (Mylotarg®), panitumumab (Vectibix™), rituximab (Rituxan®) y tositumomab (BEXXAR®); inhibidores de tirosina cinasas tales como gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW-572016; Tykerb®), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar®), mesilato de imatinib (Gleevec®), leflunomida (SU101), vandetanib (ZACTIMA™; ZD6474), pelitinib, CP-654577, CP-724714, HKI-272, PKI-166, AEE788, BMS-599626, HKI-357, BIBW 2992, ARRY-334543, JNJ-26483327 y JNJ-26483327 y combinaciones de los mismos.

Los agentes antiproliferativos inhibidores de mTOR tales como sirolimús (rapamicina), temsirolimús (CCI-779), everolimús (RAD001), BEZ235 y XL765; inhibidores de AKT tales como acetato de 1L6-hidroximetil-quirositol-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-sn-glicerocarbonato, 9-metoxi-2-metileipticinio, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-bencimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-clorofenoxazina, 3-formilcromona tiosemicarbazona (complejo Cu(II)Cl₂), API-2, un péptido de 15 meros derivado de los aminoácidos 10-24 del protoncogén TCL1 (Hiroimura et al., J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1 y los compuestos descritos en Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc., 125:1144-1145 (2003) y Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476 (2003); inhibidores de PI3K tales como PX-866, wortmanina, LY 294002, quercetina, citrato de tetrodotoxina, maleato de tioperamida, GDC-0941 (957054-30-7), IC87114, PI-103, PIK93, BEZ235 (NVP-BEZ235), TGX-115, ZSTK474, (-)-deguelina, NU 7026, miricetina, tandutinib, bismesilato de GDC-0941, GSK690693, KU-55933, MK-2206, OSU-03012, perifosina, triciribina, XL-147, PIK75, TGX-221, NU 7441, PI 828, XL-765 y WHI-P 154; inhibidores de MEK tales como PD98059, ARRY-162, RDEA119, U0126, GDC-0973, PD184161, AZD6244, AZD8330, PD0325901 y ARRY-142886; y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de inhibidores de pan-HER incluyen PF-00299804, neratinib (HKI-272), AC480 (BMS-599626), BMS-690154, PF-02341066, HM781-36B, CI-1033, BIBW-2992 y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterápicos incluyen fármacos a base de platino (p. ej., oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iproplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (p. ej., 5-fluorouracilo, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina (Gemzar®), pemetrexed (ALIMTA®), raltitrexed, etc.), alcaloides vegetales (p. ej., vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), etc.), inhibidores de topoisomerasas (p. ej., irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (p. ej., doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes hormonoterápicos incluyen, sin limitación, inhibidores de aromatasa (p. ej., aminoglutetimida, anastrozol (Arimidex®), letrozol (Femara®), vorozol, exemestano (Aromasin®), 4-androsteno-3,6,17-triona (6-OXO), 1,4,6-androstatrieno-3,17-diona (ATD), formestano (Lentaron®), etc.), moduladores selectivos el receptor de estrógenos (p. ej., bazedoxifeno, clomifeno, fulvestrant, lasofoxifeno, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, etc.), esteroides (p. ej., dexametasona), finasteride u agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) tales como la goserelina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de vacunas contra el cáncer útiles en la presente invención incluyen ANYARA de Active Biotech, DCVax-LB de Northwest Biotherapeutics, EP-2101 de IDM Pharma, GV1001 de Pharmexa, IO-2055 de Idera Pharmaceuticals, INGN 225 de Introgen Therapeutics y Stimuvax de Biomira/Merck.

Los ejemplos de agentes radioterápicos incluyen, pero sin limitación, radionúclidos tales como ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁹Sr, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At y ²¹²Bi, opcionalmente conjugados con anticuerpos dirigidos contra antígenos del tumor.

En la invención, el fármaco antineoplásico es una combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel ("tratamiento triple"). En algunos casos, el paclitaxel es paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (nab) (Abraxane® o nabP). En otros modos de realización, el fármaco antineoplásico comprende uno o más de los siguientes: bevacizumab (Avastin®), carboplatino, paclitaxel (p. ej., nabP), iniparib (BSI 201; 4-yodo-3-nitrobenzamida), NK012 (un nanodispositivo liberador de SN-38 construido por la unión covalente de SN-38 al copolímero en bloque de PEG-PGlu, seguido del autoensamblaje de copolímeros en bloque anfifílicos en medio acuoso), glembatumumab vedotina (conocido también como CDX-011 o CR011-vcMMAE; anticuerpo monoclonal humano glembatumumab (CR011) enlazado a monometil auriestatina E (MMAE) que se dirige a células cancerosas que expresan la glucoproteína transmembranaria NMB) o combinaciones de los mismos. En un modo de realización en particular, el fármaco antineoplásico es una combinación de iniparib (un inhibidor de PARP), gemcitabina (Gemzar®) y carboplatino.

En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden además determinar el nivel de expresión y/o el grado de activación de una o más moléculas de transducción de señales adicionales en el extracto celular. Los ejemplos no limitantes de moléculas de transducción de señales adicionales que se pueden estudiar para determinar los niveles de expresión (p. ej., la cantidad total) y/o el grado de activación (p. ej., la fosforilación) de una muestra tal como un extracto celular incluyen tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas que no son receptoras, componentes tirosina cinasa de cascadas de señalización, receptores nucleares de hormonas, coactivadores de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de moléculas y rutas de transducción de señales que se pueden estudiar usando la presente invención incluyen las que se muestran en la tabla 2 de la publicación PCT N° WO 2010/132723. En modos de realización en particular, las una o más moléculas de transducción de señales adicionales se seleccionan del grupo que consiste en HER2, p95HER2, HER3, HER4, PI3K, AKT, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, P70S6K, GSK-3β, Shc, c-MET, VEGFR1, VEGFR3, a dímero receptor y combinaciones de las mismas.

En determinados modos de realización, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (p. ej., total) y/o el grado de activación (p. ej., fosforilación) de uno o más (p. ej., al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales en el extracto celular. En algunos modos de realización, los uno o más (p. ej., al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales comprenden una o más moléculas de transducción de señales seleccionadas del grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas que no son receptoras, componentes tirosina cinasa de cascadas de señalización, receptores nucleares de hormonas, coactivadores de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

En modos de realización en particular, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (p. ej., total) y/o el grado de activación (p. ej., fosforilación) de uno o cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de los siguientes analitos adicionales en un extracto celular: HER2, p95HER2, HER3, HER4, PI3K, AKT, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, P70S6K, GSK-3 β , Shc, c-MET, VEGFR1, VEGFR3, PDK2, Raf, SRC, NF κ B-I κ B, mTOR, EPH-A, EPH-B, EPH-C, EPH-D, FLT-3, TIE-1, TIE-2, c-FMS, Abl, FTL 3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ER, PR, NCOR, AIB1, RON, PIP2, PIP3, p27, tirosina fosfatasas de proteínas (p. ej., PTP1B, PTPN13, BDP 1, etc.), dímeros de receptores y combinaciones de los mismos.

10 IV. Construcción de matrices de anticuerpos

En determinados aspectos, se detecta el nivel de expresión y/o el estado de activación de uno o más (p. ej., una pluralidad) de analitos (p. ej., moléculas de transducción de señales) en un extracto celular de células tumorales tales como células de cáncer de mama usando una matriz a base de anticuerpos que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura restringidos sobre un soporte sólido. Típicamente, las matrices comprenden una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes a un intervalo de concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie del soporte sólido en diferentes ubicaciones dirigibles. En un modo de realización, la matriz comprende anticuerpos de captura para detectar y/o cuantificar la expresión y/o la activación de al menos uno o más de VEGFR2, c-KIT, HER1 y/o IGF-1R y uno o más controles tales como, p. ej., un control negativo (p. ej., un control de IgG), una curva de calibrado generada para el analito de interés y/o un control positivo (p. ej., un control de pan-CK).

En un modo de realización en particular, la presente invención proporciona una matriz dirigible que tiene un intervalo dinámico superior que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura restringidos sobre un soporte sólido, en la que los anticuerpos de captura de cada serie de dilución son específicos para uno o más analitos que corresponden a un componente de una ruta de transducción de señales y otras proteínas objetivo. En diversos aspectos, este modo de realización incluye matrices que comprenden componentes de rutas de transducción de señales características de tumores en particular, p. ej., rutas de transducción de señales activas en células de cáncer de mama. Por tanto, de forma ventajosa, se puede poner en práctica la presente invención en la que cada molécula de transducción de señales u otra proteína de interés con un posible defecto de expresión o activación que provoque cáncer de mama se representa en una matriz o un chip individual. En algunos aspectos, los componentes de una ruta de transducción de señales dada activa en una célula tumoral en particular se disponen en una matriz en una secuencia lineal que corresponde a la secuencia en la que se transmite la información a través de una ruta de transducción de señales en el interior de una célula. Se describen ejemplos de matrices de este tipo en el presente documento y también se muestran en las figuras 5-9 de la publicación PCT N^o WO2009/108637. Los anticuerpos de captura específicos para uno o más componentes de una ruta de transducción de señales dada activa en una célula tumoral en particular también se pueden imprimir de manera aleatoria para reducir al mínimo los artefactos relacionados con la superficie.

El soporte sólido puede comprender cualquier sustrato adecuado para inmovilizar proteínas. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio (p. ej., un portaobjetos de vidrio), plástico, chips, clavijas, filtros, perlas, papel, membranas, haces de fibras, geles, metal, cerámica y similares. Para su uso como soportes sólidos en las matrices de la presente invención, son adecuadas membranas tales como el nailon (BiotransTM, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe®, Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), la nitrocelulosa (Protran®, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) y el PVDF (ImmobilonTM, Millipore Corp. (Billerica, MA)). Preferentemente, los anticuerpos de captura se restringen sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa, p. ej., portaobjetos FAST®, que están disponibles comercialmente de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Los aspectos particulares del soporte sólido que son deseables incluyen la capacidad para unir grandes cantidades de anticuerpos de captura y la capacidad de unir anticuerpos de captura con una desnaturalización mínima. Otro aspecto adecuado es que el soporte sólido presente una "capilaridad" mínima al aplicar al soporte las soluciones de anticuerpo que contienen anticuerpos de captura. Un soporte sólido con capilaridad mínima permite aplicar alícuotas pequeñas de solución de anticuerpo de captura al soporte para dar lugar a manchas pequeñas definidas de anticuerpo de captura inmovilizado.

Típicamente, los anticuerpos de captura se restringen directa o indirectamente (p. ej., por medio de marcas de captura) sobre el soporte sólido por medio de interacciones covalentes o no covalentes (p. ej., enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En algunos modos de realización, los anticuerpos de captura se unen covalentemente al soporte sólido usando un entrecruzador homobifuncional o heterobifuncional usando procedimientos y condiciones estándar de entrecruzamiento. Existen entrecruzadores adecuados disponibles comercialmente de proveedores tales como, p. ej., Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Los procedimientos para generar matrices adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, cualquier técnica usada para construir matrices de proteínas o ácidos nucleicos. En algunos modos de realización, los anticuerpos de captura se disponen como manchas sobre una matriz usando un Microspotter, que, típicamente es una impresora robótica equipada con pasadores, clavijas romas o impresión por inyección de tinta.

Los sistemas robóticos adecuados para imprimir las matrices de anticuerpos descritas en el presente documento incluyen el robot PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) con pasadores ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA), así como otras impresoras robóticas disponibles de BioRobics (Woburn, MA) y Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Preferentemente, se disponen como manchas al menos 2, 3, 4, 5 o 6 réplicas de cada dilución de anticuerpo de captura sobre la matriz.

Otro procedimiento para generar matrices adecuado para su uso en la presente invención comprende dispensar un volumen conocido de una dilución de un anticuerpo de captura en cada posición de la matriz seleccionada poniendo en contacto un dispensador por capilaridad sobre un soporte sólido en condiciones eficaces para atraer un volumen de líquido definido sobre el soporte, en el que este procedimiento se repite usando diluciones de anticuerpo de captura seleccionadas en cada posición de la matriz seleccionada para crear una matriz completa. El procedimiento se puede poner en práctica para formar una pluralidad de matrices de este tipo, donde la etapa de depósito de soluciones se aplica a una posición seleccionada en cada uno de una pluralidad de soportes sólidos en cada ciclo repetido. Se puede encontrar una descripción adicional de este procedimiento, p. ej., en la patente de EE. UU. N° 5.807.522.

En determinados casos, se pueden usar dispositivos para imprimir en papel para generar las matrices de anticuerpos. Por ejemplo, se puede cargar el anticuerpo de captura deseado en el cabezal de impresión de una impresora por inyección de tinta de sobremesa e imprimirlo sobre un soporte sólido adecuado (véase, p. ej., Silzel et al., Clin. Chem., 44:2036-2043 (1998)).

En algunos modos de realización, la matriz generada sobre el soporte sólido tiene la densidad de al menos aproximadamente 5 manchas/cm² y, preferentemente, de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000 o 10.000 manchas/cm².

En determinados casos, cada una de las manchas sobre el soporte sólido representa un anticuerpo de captura diferente. En otros casos determinados, varias manchas sobre el soporte sólido representan el mismo anticuerpo de captura, p. ej., como una serie de dilución que comprende una serie de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura.

Se describen ejemplos adicionales de procedimientos para preparar y construir matrices de anticuerpos sobre soportes sólidos en las patentes de EE. UU. N° 6.197.599, 6.777.239, 6.780.582, 6.897.073, 7.179.638 y 7.192.720; en las publicaciones de patente de EE. UU. N° 20060115810, 20060263837, 20060292680, y 20070054326; y en Varnum et al., Methods Mol. Biol., 264:161-172 (2004).

En la técnica se conocen procedimientos para escanear matrices de anticuerpos e incluyen, sin limitación, cualquier técnica usada para escanear matrices de proteínas o ácidos nucleicos. Existen escáneres de micromatrices adecuados para su uso en la presente invención de Perkin Elmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA) y Axon Instruments (Union City, CA). Como ejemplo no limitante, se puede usar un GSI ScanArray3000 para la detección de fluorescencia con el programa informático ImaGene para la cuantificación.

V. Ensayos de detección sencillos

En algunos modos de realización, el ensayo para detectar el nivel de expresión y/o el grado de activación de uno o más analitos (p. ej., una o más moléculas de transducción de señales) de interés en un extracto celular de células tales como células tumorales es un ensayo múltiple de alto rendimiento de dos anticuerpos con un intervalo dinámico superior. Como ejemplo no limitante, los dos anticuerpos usados en el ensayo pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para un analito de interés en particular; y (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del analito (es decir, un anticuerpo dependiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación puede detectar, por ejemplo, el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejos del analito. De forma alternativa, el anticuerpo de detección comprende un anticuerpo independiente del estado de activación, que detecta la cantidad total del analito en el extracto celular. En general, el anticuerpo independiente del estado de activación puede detectar tanto las formas activadas como las no activadas del analito.

En un modo de realización en particular, el ensayo de dos anticuerpos para detectar el nivel de expresión o el grado de activación de un analito de interés comprende:

(i) incubar el extracto celular con una o una pluralidad de serie de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados;

(ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección específicos para los analitos correspondientes para formar una pluralidad de analitos capturados detectables, en la que los anticuerpos de detección comprenden anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar el grado de activación (p.

ej., fosforilación) del analito o anticuerpos independientes del estado de activación para detectar el nivel de expresión (p. ej., cantidad total) del analito;

5 (iii) incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un primer y un segundo miembro de un par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

(iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y el segundo miembro del par de amplificación de la señal.

10 Típicamente, los ensayos de dos anticuerpos descritos en el presente documento son matrices a base de anticuerpos que comprenden una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes a un intervalo de concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en diferentes ubicaciones dirigibles. Anteriormente se describen ejemplos de soportes sólidos adecuados para su uso en la presente invención.

15 Preferentemente, los anticuerpos de captura y los anticuerpos de detección se seleccionan para reducir al mínimo la competición entre ellos con respecto a la unión de analitos (es decir, que tanto los anticuerpos de captura como los de detección puedan unir simultáneamente sus moléculas de transducción de señales correspondientes).

20 En un modo de realización, los anticuerpos de detección comprenden un primer miembro de un par de unión (p. ej., biotina) y el primer miembro del par de amplificación de la señal comprende un segundo miembro del par de unión (p. ej., estreptavidina). Los miembros del par de unión se pueden acoplar directa o indirectamente a los anticuerpos de detección o al primer miembro del par de amplificación de la señal usando procedimientos bien conocidos en la técnica. En determinados casos, el primer miembro del par de amplificación de la señal es una peroxidasa (p. ej., peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, eosinófilo peroxidasa, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa tiroidea, desyodinasas, etc.) y el segundo
25 miembro del par de amplificación de la señal es un reactivo de tiramida (p. ej., biotina-tiramida). En estos casos, la señal amplificada se genera por la oxidación por la peroxidasa del reactivo de tiramida para producir una tiramida activada en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

30 La tiramida se detecta directamente o se detecta tras la adición de un reactivo de detección de señales tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromógeno. Los ejemplos de fluoróforo adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, un tinte Alexa Fluor® (p. ej., Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra-rodamina (TRITC), un lumíforo CyDye™ (p. ej., Cy2,
35 Cy3, Cy5) y similares. La marca de estreptavidina se puede acoplar directa o indirectamente al fluoróforo o la peroxidasa usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de reactivos cromógenos adecuados para su uso en la presente invención incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

40 En el ejemplo 3 de la publicación PCT N° WO2009/108637 se proporciona un protocolo ejemplar para realizar los ensayos de dos anticuerpos descritos en el presente documento.

45 En otro modo de realización de un planteamiento de dos anticuerpos, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar el nivel de expresión o el grado de activación de un receptor truncado, procedimiento que comprende:

50 (i) incubar el extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para la región de unión de un dominio extracelular (DEC) de un receptor de longitud completa;

(ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa para formar un extracto celular carente del receptor de longitud completa;

55 (iii) incubar el extracto celular carente del receptor de longitud completa con una serie de dilución de uno o una pluralidad de anticuerpos de captura específicos para la región de unión de un dominio intracelular (DIC) del receptor de longitud completa para formar una pluralidad de receptores truncados capturados;

60 (iv) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección específicos para la región de unión de un DIC del receptor de longitud completa para formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables, en la que los anticuerpos de detección comprenden anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar el grado de activación (p. ej., fosforilación) del receptor truncado o anticuerpos independientes del estado de activación para detectar el nivel de expresión (p. ej., cantidad total) del receptor truncado;

65 (v) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un primer y un segundo miembro de un par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

(vi) detectar una señal amplificada generada a partir del primer y el segundo miembro del par de amplificación de la señal.

5 En determinados modos de realización, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa es HER2. En otros modos de realización determinados, la pluralidad de perlas específicas para la región de unión de un dominio extracelular (DEC) comprende un par estreptavidina-biotina, en el que la biotina está unida a la perla y la biotina está unida a un anticuerpo (p. ej., en el que el anticuerpo es específico para la región de unión del DEC del receptor de longitud completa).

10 La figura 14A de la publicación PCT N° WO2009/108637 muestra que las perlas recubiertas con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular (DEC) de un receptor de interés se unen al receptor de longitud completa (p. ej., HER2), pero no al receptor truncado (p. ej., p95HER2) para retirar todo el receptor de longitud completa del ensayo. La figura 14B de la publicación PCT N° WO2009/108637 muestra que el receptor truncado (p. ej., p95HER2), una vez unido a un anticuerpo de captura, se puede detectar mediante un anticuerpo de detección que es específico para el dominio intracelular (DIC) del receptor de longitud completa (p. ej., HER2). El anticuerpo de detección se puede conjugar directamente con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después, se puede realizar la amplificación de la señal con tiramida (AST) para generar una señal para su detección. Se puede estudiar el nivel de expresión o el estado de activación del receptor truncado (p. ej., p95HER2) para determinar, p. ej., su concentración total o su estado de fosforilación, su estado de ubiquitinación y/o su estado de formación de complejos.

20 En otro modo de realización, la presente invención proporciona kits para realizar los ensayos de dos anticuerpos descritos anteriormente, que comprenden: (a) una serie de dilución de uno o una pluralidad de anticuerpos de captura restringidos sobre un soporte sólido; y (b) uno o una pluralidad de anticuerpos de detección (p. ej., anticuerpos independientes del estado de activación y/o anticuerpos dependientes del estado de activación). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones para los procedimientos de uso del kit para detectar los niveles de expresión y/o los estados de activación de una o una pluralidad de moléculas de transducción de señales de células tales como células tumorales. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales descritos anteriormente con respecto a la realización de los procedimientos específicos de la presente invención tales, como, por ejemplo, un primer y un segundo miembro de un par de amplificación de la señal, reactivos de tiramida de amplificación de la señal, tampones de lavado, etc.

VI. Ensayos de detección duales de proximidad

35 En algunos modos de realización, el ensayo para detectar el nivel de expresión y/o el grado de activación de uno o más analitos (p. ej., una o más moléculas de transducción de señales) de interés en un extracto celular de células tales como células tumorales es un ensayo múltiple de alto rendimiento de proximidad (es decir, de tres anticuerpos) con un intervalo dinámico superior. Como ejemplo no limitante, los tres anticuerpos usados en el ensayo de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para un analito de interés en particular; (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del analito (es decir, un anticuerpo dependiente del estado de activación); y (3) un anticuerpo de detección que detecta la cantidad total del analito (es decir, un anticuerpo independiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación puede detectar, p. ej., el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejos del analito, mientras que el anticuerpo independiente del estado de activación puede detectar la cantidad total (es decir, tanto la forma activada como la forma no activada) del analito.

45 En un modo de realización en particular, el ensayo de proximidad para detectar el estado o el grado de activación de un analito de interés comprende:

50 (i) incubar el extracto celular con una o una pluralidad de diluciones en serie de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados;

(ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación y uno o una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes para formar una pluralidad de analitos capturados detectables, en los que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitador, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitador genera un agente oxidante canalizado hacia y que reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

60 (iii) incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

(iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y el segundo miembro del par de amplificación de la señal.

65

En otro modo de realización en particular, el ensayo de proximidad para detectar el estado o el grado de activación de un analito de interés que es un receptor truncado comprende:

5 (i) incubar el extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para la región de unión de un dominio extracelular (DEC) de un receptor de longitud completa;

(ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa para formar un extracto celular carente del receptor de longitud completa;

10 (iii) incubar el extracto celular carente del receptor de longitud completa con uno o una pluralidad de anticuerpos de captura específicos para la región de unión de un dominio intracelular (DIC) del receptor de longitud completa para formar una pluralidad de receptores truncados capturados;

15 (iv) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación y uno o una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para la región de unión de un DIC del receptor de longitud completa para formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables, en los que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitador, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitador genera un agente oxidante canalizado hacia y que reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

20 (v) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

25 (vi) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y el segundo miembro del par de amplificación de la señal.

30 En determinados modos de realización, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa es HER2. En otros modos de realización determinados, la pluralidad de perlas específicas para la región de unión de un dominio extracelular (DEC) comprende un par estreptavidina-biotina, en el que la biotina está unida a la perla y la biotina está unida a un anticuerpo (p. ej., en el que el anticuerpo es específico para la región de unión del DEC del receptor de longitud completa).

35 En modos de realización alternativos, los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden estar marcados con un resto facilitador y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden estar marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal.

40 Como otro ejemplo no limitante, los tres anticuerpos usados en el ensayo de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para un analito de interés en particular; (2) un primer anticuerpo de detección que detecta la cantidad total del analito (es decir, un primer anticuerpo independiente del estado de activación); y (3) un segundo anticuerpo de detección que detecta la cantidad total del analito (es decir, un segundo anticuerpo independiente del estado de activación). En modos de realización preferentes, el primer y el segundo anticuerpo independiente del estado de activación reconocen epítopos diferentes (p. ej., independientes) en el analito.

45 En un modo de realización en particular, el ensayo de proximidad para detectar el nivel de expresión de un analito de interés comprende:

50 (i) incubar el extracto celular con una o una pluralidad de serie de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados;

(ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una pluralidad de un primer y un segundo anticuerpo independiente del estado de activación específicos para los analitos correspondientes para formar una pluralidad de analitos capturados detectables,

55 en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitador, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitador genera un agente oxidante canalizado hacia y que reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

60 (iii) incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

65 (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y el segundo miembro del par de amplificación de la señal.

En otro modo de realización en particular, el ensayo de proximidad para detectar el nivel de expresión de un analito de interés que es un receptor truncado comprende:

5 (i) incubar el extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para la región de unión de un dominio extracelular (DEC) de un receptor de longitud completa;

(ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa para formar un extracto celular carente del receptor de longitud completa;

10 (iii) incubar el extracto celular carente del receptor de longitud completa con uno o una pluralidad de anticuerpos de captura específicos para la región de unión de un dominio intracelular (DIC) del receptor de longitud completa para formar una pluralidad de receptores truncados capturados;

15 (iv) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una pluralidad de un primer y un segundo anticuerpo independiente del estado de activación específicos para la región de unión de un DIC del receptor de longitud completa para formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables,

20 en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitador, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitador genera un agente oxidante canalizado hacia y que reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

25 (v) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

(vi) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y el segundo miembro del par de amplificación de la señal.

30 En determinados modos de realización, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa es HER2. En otros modos de realización determinados, la pluralidad de perlas específicas para la región de unión de un dominio extracelular (DEC) comprende un par estreptavidina-biotina, en el que la biotina está unida a la perla y la biotina está unida a un anticuerpo (p. ej., en el que el anticuerpo es específico para la región de unión del DEC del receptor de longitud completa).

35 En modos de realización alternativos, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación pueden estar marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y los segundos anticuerpos independientes del estado de activación pueden estar marcados con un resto facilitador.

40 Típicamente, los ensayos de proximidad descritos en el presente documento son matrices a base de anticuerpos que comprenden uno o una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes a un intervalo de concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en diferentes ubicaciones dirigibles. Anteriormente se describen ejemplos de soportes sólidos adecuados para su uso en la presente invención.

45 Preferentemente, los anticuerpos de captura, los anticuerpos independientes del estado de activación y los anticuerpos dependientes del estado de activación se seleccionan para reducir al mínimo la competición entre ellos con respecto a la unión de analitos (es decir, que todos los anticuerpos puedan unir simultáneamente sus moléculas de transducción de señales correspondientes).

50 En algunos modos de realización, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar el grado de activación de uno o más de los analitos o, de forma alternativa, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión de uno o más de los analitos, comprenden además un resto detectable. En esos casos, la cantidad del resto detectable es correlativa a la cantidad de uno o más de los analitos del extracto celular. Los ejemplos de restos detectables incluyen, pero sin limitación, marcas fluorescentes, marcas químicamente reactivas, marcas enzimáticas, marcas radioactivas y similares. Preferentemente, el resto detectable es un fluoróforo tal como un tinte Alexa Fluor® (p. ej., Alexa Fluor® 647), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra rodamina (TRITC), un lumíforo CyDye™ (p. ej., Cy2, Cy3, Cy5) y similares. La marca detectable se puede acoplar directa o indirectamente a los anticuerpos independientes del estado de activación usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

60 En determinados casos, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar el grado de activación de uno o más de los analitos o, de forma alternativa, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión de uno o más de los analitos están unidos directamente al resto facilitador. El resto facilitador se puede acoplar a los anticuerpos independientes del estado de activación usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Un resto facilitador adecuado para su uso en la presente invención incluye cualquier molécula que pueda generar un agente oxidante canalizado hacia (es decir, que se dirige hacia) y

65

que reacciona con (es decir, une, se une a, o forma un complejo con) otra molécula en las proximidades (es decir, espacialmente cercana o) del resto facilitador. Los ejemplos de restos facilitadores incluyen, sin limitación, enzimas tales como la glucosa oxidasa o cualquier otra enzima que catalice una reacción de oxidación/reducción en la que participe el oxígeno molecular (O_2) como el aceptor de electrones, y fotosensibilizadores tales como el azul de metileno, rosa de Bengala, porfirinas, tintes de escuarato, ftalocianinas y similares. Los ejemplos no limitantes de agentes oxidantes incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un oxígeno singlete y cualquier otro compuesto que transfiera átomos de oxígeno o que acepte electrones en una reacción de oxidación/reducción. Preferentemente, en presencia de un sustrato adecuado (p. ej., glucosa, luz, etc.), el resto facilitador (p. ej., glucosa oxidasa, fotosensibilizador, etc.) genera un agente oxidante (p. ej., peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete, etc.) que se canaliza hacia y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal (p. ej., peroxidasa de rábano picante (HRP), un hapteno protegido por un grupo protector, una enzima inactivada por un enlace tioéter con un inhibidor enzimático, etc.) cuando los dos restos se encuentran próximos entre sí.

En otros casos determinados, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar el grado de activación de uno o más de los analitos o, de forma alternativa, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de expresión de uno o más de los analitos están marcados indirectamente con el resto facilitador por hibridación entre un enlazador oligonucleotídico conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un enlazador oligonucleotídico complementario conjugado con el resto facilitador. Los enlazadores oligonucleotídicos se pueden acoplar al resto facilitador o a los anticuerpos independientes del estado de activación usando procedimientos bien conocidos en la técnica. En algunos modos de realización, el enlazador oligonucleotídico conjugado con el resto facilitador tiene una complementariedad del 100 % con el enlazador oligonucleotídico conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación. En otros modos de realización, el par de enlazadores oligonucleotídicos comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones no coincidentes, p. ej., después de la hibridación en condiciones de hibridación rigurosas. Un experto en la técnica apreciará que los anticuerpos independientes del estado de activación específicos para diferentes analitos se pueden conjugar con el mismo enlazador oligonucleotídico o con enlazadores oligonucleotídicos diferentes.

La longitud de los enlazadores oligonucleotídicos que se conjugan con el resto facilitador o con los anticuerpos independientes del estado de activación puede variar. En general, la secuencia del enlazador puede tener al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos de longitud. Típicamente, se generan secuencias de ácido nucleico aleatorias para el acoplamiento. Como ejemplo no limitante, se puede diseñar una colección de enlazadores oligonucleotídicos que tengan tras dominios contiguos distintos: un dominio espaciador; un dominio característico y un dominio de conjugación. Preferentemente, los enlazadores oligonucleotídicos se diseñan para un acoplamiento eficaz sin destruir la función del resto facilitador o de los anticuerpos independientes del estado de activación con los que se conjugan.

Las secuencias de los enlazadores oligonucleotídicos se pueden diseñar para evitar o reducir al mínimo la formación de cualquier estructura secundaria en una variedad de condiciones de ensayo. Típicamente, se realiza un seguimiento cuidadoso de las temperaturas de fusión para cada segmento del enlazador para permitir su participación en los procedimientos generales de ensayo. En general, el intervalo de temperaturas de fusión del segmento de la secuencia enlazadora está entre 1 y 10 °C. Para analizar cada uno de los tres dominios diferentes de cada enlazador, se pueden usar algoritmos informáticos (p. ej., OLIGO 6.0) para determinar la temperatura de fusión, la estructura secundaria y la estructura de horquilla a concentraciones iónicas definidas. También se puede analizar el total de las secuencias combinadas para determinar su caracterización estructural y su comparabilidad con las secuencias de otros enlazadores oligonucleotídicos conjugados, p. ej., si hibridarán o no en condiciones de hibridación rigurosas con un enlazador oligonucleotídico complementario.

La región espaciadora del enlazador oligonucleotídico proporciona una separación adecuada del dominio de conjugación con respecto al sitio de entrecruzamiento del oligonucleótido. El dominio de conjugación sirve para enlazar moléculas marcadas con una secuencia de enlazador oligonucleotídico complementaria al dominio de conjugación por medio de hibridación de ácidos nucleicos. La hibridación mediada por ácidos nucleicos se puede realizar tanto antes como después de la formación del complejo de anticuerpo-analito (es decir, antígeno), lo que permite un formato de ensayo más flexible. A diferencia de muchos procedimientos de conjugación de anticuerpos directos, enlazar oligonucleótidos relativamente pequeños con anticuerpos u otras moléculas tiene un impacto mínimo sobre la afinidad específica de los anticuerpos por su analito objetivo o sobre la función de las moléculas conjugadas.

En algunos modos de realización, se puede usar el dominio de secuencia característica del enlazador oligonucleotídico en ensayos de proteínas múltiples complejos. Se pueden conjugar varios anticuerpos con enlazadores oligonucleotídicos con diferentes secuencias características. En los inmunoensayos múltiples, se pueden usar secuencias oligonucleotídicas indicadoras marcadas con sondas apropiadas para detectar la reactividad cruzada entre anticuerpos y sus antígenos en el formato de ensayo múltiple.

Los enlazadores oligonucleotídicos se pueden conjugar con anticuerpos u otras moléculas usando varios procedimientos diferentes. Por ejemplo, se pueden sintetizar enlazadores oligonucleotídicos con un grupo tiol en el

extremo 5' o 3'. Se puede desproteger el grupo tiol usando agentes reductores (p. ej., TCEP-HCl) y se pueden purificar los enlazadores resultantes con el uso de una columna centrifugadora de desalado. Se pueden conjugar los enlazadores oligonucleotídicos desprotegidos resultantes con las aminas primarias de anticuerpos u otros tipos de proteínas usando entrecruzadores heterobifuncionales tales como SMCC. De forma alternativa, se pueden tratar los grupos 5'-fosfato de los oligonucleótidos con carbodiimida EDC hidrosoluble para formar ésteres de fosfato y acoplarlos posteriormente a moléculas que contienen aminas. En determinados casos, se puede oxidar el diol del residuo 3'-ribosa para obtener grupos aldehído y después conjugarlos con los grupos amino de anticuerpos u otros tipos de proteínas usando una aminación reductora. En otros casos determinados, se puede sintetizar el enlazador oligonucleotídico con una modificación de biotina en el extremo 3' o 5' y conjugarlo con moléculas marcadas con estreptavidina.

Se pueden sintetizar enlazadores oligonucleotídicos usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como las que se describen en Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); y Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). En general, en la síntesis de oligonucleótidos se hace uso de grupos protectores de ácidos nucleicos y de acoplamiento comunes, tales como dimetoxitriilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Los expertos en la técnica conocen reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, procedimientos para la desprotección de ácidos nucleicos y procedimientos para la purificación de ácidos nucleicos.

En determinados casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar el grado de activación de uno o más de los analitos o, de forma alternativa, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión de uno o más de los analitos están marcados directamente con el primer miembro del par de amplificación de la señal. El miembro del par de amplificación de la señal se puede acoplar a los anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar el grado de activación o a los segundos anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de expresión usando procedimientos conocidos en la técnica. En otros casos determinados, los anticuerpos dependientes del estado de activación o los segundos anticuerpos independientes del estado de activación se marcan indirectamente con el primer miembro del par de amplificación de la señal por medio de la unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado con los anticuerpos dependientes del estado de activación o los segundos anticuerpos independientes del estado de activación y un segundo miembro del par de unión conjugado con el primer miembro del par de amplificación de la señal. Los miembros del par de unión (p. ej., biotina/estreptavidina) se pueden acoplar al miembro del par de amplificación de la señal o a los anticuerpos dependientes del estado de activación o los segundos anticuerpos independientes del estado de activación usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de miembros del par de amplificación de la señal incluyen, pero sin limitación, peroxidasa tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, eosinófilo peroxidasa, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa tiroidea, desyodinasas y similares. Otros ejemplos de miembros del par de amplificación de la señal incluyen haptenos protegidos con un grupo protector y enzimas inactivadas por enlaces tioéter con un inhibidor enzimático.

En un ejemplo de canalización de proximidad, el resto facilitador es glucosa oxidasa (GO) y el primer miembro del par de amplificación de la señal es peroxidasa de rábano picante (HRP). Cuando la GO se pone en contacto con un sustrato tal como la glucosa, genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno (H₂O₂)). Si la HRP se encuentra en las proximidades de la zona de canalización de la GO, el H₂O₂ generado por la GO se canaliza hacia y forma un complejo con la HRP para formar un complejo de HRP-H₂O₂ que, en presencia de un segundo miembro del par de amplificación de la señal (p. ej., un sustrato quimioluminiscente tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorógeno tal como tiramida (p. ej., biotina-tiramida), ácido homovainílico o ácido 4-hidroxifenilacético), genera una señal amplificada. Se describen procedimientos de uso de la GO y la HRP en un ensayo de proximidad, p. ej., en Langry et al., Informe del Dpto. de Energía de EE. UU. N° UCRL-ID-136797 (1999). Cuando se usa biotina-tiramida como el segundo miembro del par de amplificación de la señal, el complejo de HRP-H₂O₂ oxida la tiramida para generar un radical de tiramida reactivo que se une covalentemente a los residuos nucleófilos cercanos. La tiramida se detecta directamente o se detecta tras la adición de un reactivo de detección de señales tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromógeno. Los ejemplos de fluoróforo adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, un tinte Alexa Fluor® (p. ej., Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra-rodamina (TRITC), un lumíforo CyDye™ (p. ej., Cy2, Cy3, Cy5) y similares. La marca de estreptavidina se puede acoplar directa o indirectamente al fluoróforo o la peroxidasa usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de reactivos cromógenos adecuados para su uso en la presente invención incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

En otro ejemplo de canalización de proximidad, el resto facilitador es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de la señal es una molécula grande marcada con varios haptenos que están protegidos con grupos protectores que evitan la unión de los haptenos a un compañero de unión específica (p. ej., un ligando, un anticuerpo, etc.). Por ejemplo, el miembro del par de amplificación de la señal puede ser una molécula de dextrano con moléculas de biotina, cumarina y/o fluoresceína protegidas. Los grupos protectores adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos protectores fenoxi, analino, olefina, tioéter y selenoéter. En la patente de EE. UU. N° 5.807.675 se

describen fotosensibilizadores y moléculas de hapteno protegidas adicionales para su uso en los ensayos de proximidad de la presente invención. Cuando se excita el fotosensibilizador con luz, genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singlete). Si las moléculas de hapteno se encuentran en las proximidades de la zona de canalización del fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza hacia y reacciona con tioéteres de los grupos protectores de los haptenos para proporcionar grupos carbonilo (cetona o aldehídos) y ácido sulfínico, liberando los grupos protectores de los haptenos. Después, los haptenos desprotegidos quedan disponibles para unirse específicamente al segundo miembro del par de amplificación de la señal (p. ej., un compañero de unión específica que puede generar una señal detectable). Por ejemplo, cuando el hapteno es biotina, el compañero de unión específica puede ser una estreptavidina marcada con una enzima. Las enzimas ejemplares incluyen fosfatasa alcalina, p-galactosidasa, HRP, etc. Después del lavado para retirar los reactivos no unidos, se puede generar la señal detectable mediante la adición de un sustrato detectable (p. ej., fluorescente, quimioluminiscente, cromógeno, etc.) de la enzima y detectarlo usando procedimientos e instrumentación adecuados conocidos en la técnica. De forma alternativa, se puede amplificar la señal detectable usando la amplificación de señal con tiramida y detectar la tiramida activada directamente o detectarla después de la adición de un reactivo de detección de la señal como se describe anteriormente.

En otro ejemplo más de canalización de proximidad, el resto facilitador es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de la señal es un complejo de enzima-inhibidor. La enzima y el inhibidor (p. ej., dextrano marcado con ácido fosfónico) se enlazan mediante un enlazador escindible (p. ej., tioéter). Cuando se excita el fotosensibilizador con luz, genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singlete). Si el complejo de enzima-inhibidor se encuentra en las proximidades de la zona de canalización del fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza hacia y reacciona con el enlazador escindible, liberando el inhibidor de la enzima, de modo que se activa la enzima. Se añade un sustrato de la enzima para generar una señal detectable o, de forma alternativa, se añade un reactivo de amplificación para generar una señal amplificada.

En otro ejemplo de canalización de proximidad, el resto facilitador es HRP, el primer miembro del par de amplificación de la señal es un hapteno protegido o un complejo de enzima-inhibidor como se describe anteriormente y los grupos protectores comprenden p-alcoxifenol. La adición de fenilendiamina y H_2O_2 genera una fenilendiimina reactiva que se canaliza hacia el hapteno protegido o el complejo de enzima-inhibidor y reacciona con grupos protectores de p-alcoxifenol para proporcionar haptenos expuestos o una enzima reactiva. La señal amplificada se genera y se detecta como se describe anteriormente (véanse, p. ej., las patentes de EE. UU. N° 5.532.138 y 5.445.944).

En el ejemplo 4 de la publicación PCT N° WO2009/108637 se proporciona un protocolo ejemplar para realizar los ensayos de proximidad descritos en el presente documento.

En otro modo de realización, la presente invención proporciona kits para realizar los ensayos de proximidad descritos anteriormente, que comprenden: (a) una serie de dilución de uno o una pluralidad de anticuerpos de captura restringidos sobre un soporte sólido; y (b) uno o una pluralidad de anticuerpos de detección (p. ej., una combinación de anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar el grado de activación y/o una combinación de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones para los procedimientos de uso del kit para detectar los estados de expresión y/o activación de una o una pluralidad de moléculas de transducción de señales de células tales como células tumorales. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales descritos anteriormente con respecto a la realización de los procedimientos específicos de la presente invención tales, como, por ejemplo, un primer y un segundo miembro de un par de amplificación de la señal, reactivos de tiramida de amplificación de la señal, sustratos para el resto facilitador, tampones de lavado, etc.

VII. Producción de anticuerpos

La generación y selección de anticuerpos que todavía no están disponibles comercialmente para analizar los niveles de expresión y el grado de activación de moléculas de transducción de señales en células tumorales de acuerdo con los inmunoensayos de la presente invención se pueden lograr de varias maneras. Por ejemplo, una manera es expresar y/o purificar un polipéptido de interés (es decir, un antígeno) usando procedimientos de expresión y purificación de proteínas conocidos en la técnica, mientras que otra manera es sintetizar el polipéptido de interés usando procedimientos de síntesis peptídica en fase sólida conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., vol. 182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., vol. 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull., 38:1192-99 (1990); Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255-60, (1995); y Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull., 44:1326-31 (1996). Después, se puede inyectar el polipéptido purificado o sintetizado, por ejemplo, en ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Un experto en la técnica reconocerá que existen muchos procedimientos disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Un experto en la técnica apreciará también que se pueden preparar fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan a anticuerpos (p. ej., mantienen sus regiones funcionales de unión) a partir de información genética por diversos procedimientos. Véanse,

p. ej., *Antibody Engineering: A Practical Approach*, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); y Huse et al., *J. Immunol.*, 149:3914-3920 (1992).

5 Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden adoptar muchos enfoques en la producción de anticuerpos o de fragmentos de unión y en el cribado y la selección en función de la afinidad y especificidad de los diversos polipéptidos de interés, si bien estos enfoques no cambian el alcance de la presente invención.

10 En la publicación PCT N° WO 2010/132723 se encuentra una descripción más detallada de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de los mismos y procedimientos de purificación de anticuerpos.

VIII. Procedimientos de administración

15 De acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación, los fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento se administran a un sujeto por cualquier medio conveniente conocido en la técnica. Un experto en la técnica apreciará que los fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento se pueden administrar solos o como parte de un planteamiento terapéutico combinado con quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y/o cirugía convencionales.

20 En determinados aspectos divulgados, el fármaco antineoplásico comprende un agente antiseñalización (es decir, un agente citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina cinasas; un agente antiproliferativo; un agente quimioterápico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente hormonoterápico; un agente radioterápico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular la proliferación descontrolada de células anómalas, tales como las células cancerosas. En algunos modos de realización, se trata al sujeto con uno o más
25 agentes antiseñalización, agentes antiproliferativos y/o agentes hormonoterápicos en combinación con al menos un agente quimioterápico. Anteriormente se describen anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina cinasas, agentes antiproliferativos, agentes quimioterápicos, agentes hormonoterápicos, agentes radioterápicos y vacunas ejemplares.

30 En la invención, el fármaco antineoplásico es una combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel ("tratamiento triple"). En algunos casos, el paclitaxel es paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (nab) (Abraxane® o nabP). En otros modos de realización, el fármaco antineoplásico comprende iniparib (BSI 201; 4-yodo-3-nitrobenzamida), NK012 (un nanodispositivo liberador de SN-38 construido por la unión covalente de SN-38 al copolímero en bloque de PEG-PGlu, seguido del autoensamblaje de copolímeros en bloque anfífilos en medio
35 acuoso), glembatumumab vedotina (conocido también como CDX-011 o CR011-vcMMAE; anticuerpo monoclonal humano glembatumumab (CR011) enlazado a monometil auriestatina E (MMAE) que se dirige a células cancerosas que expresan la glucoproteína transmembranaria NMB) o combinaciones de los mismos. En un modo de realización en particular, el fármaco antineoplásico es una combinación de iniparib (un inhibidor de PARP), gemcitabina (Gemzar®) y carboplatino.

40 Los fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento se pueden coadministrar con agentes inmunoterápicos convencionales que incluyen, pero sin limitación, inmunoestimulantes (p. ej., bacilo de Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina 2, interferón alfa, etc.), inmunotoxinas (p. ej., conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33 y caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22 y exotoxina de pseudomonas, etc.) y radioinmunoterapia (p. ej., anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con ¹¹¹In, ⁹⁰Y o ¹³¹I, etc.).

45 Los fármacos antineoplásicos se pueden administrar con un excipiente farmacéutico adecuado, según convenga, y se puede llevar a cabo por medio de cualquiera de los modos de administración aceptados. Por tanto, la administración puede ser, por ejemplo, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, intraarticular, parenteral, intraarteriolar, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intravesical, intratecal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal o por inhalación. Con "coadministrar" se quiere decir que un fármaco antineoplásico se administra al mismo tiempo que, justo antes de o
50 justo después de la administración de un segundo fármaco (p. ej., otro fármaco antineoplásico, un fármaco útil para reducir los efectos secundarios asociados con el tratamiento con el fármaco antineoplásico, un agente radioterápico, un agente hormonoterápico, un agente inmunoterápico, etc.).

55 Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco antineoplásico repetidamente, p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces, o se puede administrar la dosis por infusión continua. La dosis puede adoptar la forma de formas farmacéuticas sólidas, semisólidas, polvo liofilizado o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, pastillas, bolitas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles, espumas o similares, preferentemente en formas farmacéuticas unitarias para una administración sencillas de dosificaciones precisas.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, de las

que cada unidad contiene una cantidad predeterminada de un fármaco antineoplásico calculada para que produzca las manifestaciones, la tolerabilidad y/o los efectos terapéuticos deseados, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado (p. ej., una ampolla). Además, se pueden preparar formas farmacéuticas más concentradas, a partir de las cuales se puede producir después las formas farmacéuticas unitarias más diluidas. Por tanto, las formas farmacéuticas más concentradas contendrán sustancialmente más de, p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces la cantidad del fármaco antineoplásico.

Los expertos en la técnica conocen procedimientos para preparar estas formas farmacéuticas (véase, p. ej., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Típicamente, las formas farmacéuticas incluyen un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y, adicionalmente, puede incluir otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de la permeabilidad tisular, solubilizantes y similares. Se pueden adaptar los excipientes apropiados a la forma farmacéutica y la vía de administración en particular por procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, anteriormente).

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y poli(ácidos acrílicos) tales como carbopoles, p. ej., Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Adicionalmente, las formas farmacéuticas pueden incluir agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo, etilo y propilo (es decir, los parabenos); agentes ajustadores del pH tales como ácidos y bases inorgánicas y orgánicas; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las formas farmacéuticas también pueden comprender perlas poliméricas biodegradables, dextrano y complejos de inclusión de ciclodextrina.

Para una administración oral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, pulverizadores, pastillas para chupar, polvos y formulaciones de liberación mantenida. Los excipientes adecuados para la administración oral incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

En algunos modos de realización, la dosis terapéuticamente eficaz adopta la forma de una pastilla, un comprimido o una cápsula y, por tanto, la forma farmacéutica puede contener, junto con un fármaco antineoplásico, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico y similares; un disgregante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. También se puede formular un fármaco antineoplásico como un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un vehículo de polietilenglicol (PEG).

Se pueden preparar formas farmacéuticas líquidas disolviendo o dispersando un fármaco antineoplásico y, opcionalmente, uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables, en un vehículo tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (p. ej., cloruro de sodio al 0,9 % p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión, p. ej., para administración oral, tópica o intravenosa. También se puede formular un fármaco antineoplásico como enema de retención.

Para la administración tópica, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, jaleas, soluciones, suspensiones, pomadas y parches transdérmicos. Para la administración por inhalación, se puede suministrar un fármaco antineoplásico como un polvo seco o en forma líquida por medio de un nebulizador. Para la administración parenteral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de soluciones inyectables estériles y polvos estériles envasados. Preferentemente, las soluciones inyectables se formulan a un pH de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 7,5.

La dosis terapéuticamente eficaz también se puede proporcionar en forma liofilizada. Estas formas farmacéuticas pueden incluir un tampón, p. ej., de bicarbonato, para reconstituirlas antes de su administración, o se puede incluir el tampón en la forma farmacéutica liofilizada para reconstituirla, p. ej., con agua. La forma farmacéutica liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor adecuado, p. ej., epinefrina. La forma farmacéutica liofilizada se puede proporcionar en una jeringuilla, opcionalmente envasada en combinación con el tampón para la reconstitución, de tal forma que la forma farmacéutica reconstituida se pueda administrar inmediatamente a un sujeto.

También se puede realizar un seguimiento de un sujeto a intervalos de tiempo periódicos para evaluar la eficacia de un tratamiento determinado. Por ejemplo, los niveles de expresión y/o el grado de activación de determinadas moléculas de transducción de señales pueden cambiar debido al efecto terapéutico del tratamiento con uno o más de los fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento. Se puede realizar un seguimiento del sujeto para evaluar la respuesta y comprender los efectos de determinados fármacos o tratamientos en un enfoque individualizado. Adicionalmente, los sujetos que inicialmente responden a un fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos específicos pueden hacerse resistentes al fármaco o la combinación de

fármacos, lo que indica que estos sujetos han desarrollado una resistencia a fármacos adquirida. Para estos sujetos se puede suspender el tratamiento que sigan en ese momento y prescribir un tratamiento alternativo.

5 En determinados aspectos, se pueden usar los procedimientos descritos en el presente documento junto con
 conjuntos de marcadores de expresión génica que predicen la probabilidad del pronóstico y/o la recidiva del cáncer
 de mama en diversas poblaciones. Estos conjuntos de genes pueden ser útiles para identificar individuos que tienen
 pocas posibilidades de experimentar recidivas y, por tanto, es poco probable que se beneficien de la quimioterapia
 adyuvante. Los conjuntos de expresión se pueden usar para identificar individuos que pueden evitar se forma segura
 la quimioterapia adyuvante, sin que se vean afectados negativamente los resultados de supervivencia general y sin
 10 enfermedad. Los sistemas adecuados incluyen, pero sin limitación, Oncotype DX™, que es un conjunto de 21 genes
 de Genomic Health, Inc.; MammaPrint®, que es un conjunto de 70 genes de Agendia; y un conjunto de 76 genes de
 Veridex.

15 Además, en otros aspectos determinados, se pueden usar los procedimientos descritos en el presente documento
 junto con conjuntos de marcadores de expresión génica que identifican los tumores originales de cánceres de los
 que se desconoce la localización primaria (CLPD). Estos conjuntos de genes pueden ser útiles para identificar
 pacientes con cáncer metastásico que se beneficiarían del tratamiento consistente con el que reciben los pacientes
 diagnosticados inicialmente con cáncer de mama. Los sistemas adecuados incluyen, pero sin limitación, el ensayo
 de ID de tipo de cáncer Aviara, un ensayo de expresión basado en RT-PCR que mide 92 genes para identificar el
 20 sitio primario para 39 tipos de tumor; y la prueba del tejido de origen Pathwork®, que mide la expresión de más de
 1600 genes en una matriz y compara la expresión génica "característica" de un tumor con la de 15 tipos de tejido
 conocidos.

IX. Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención que se reivindica.

Ejemplo 1. Ensayo de proximidad ilustrativo en formato de portaobjetos

30 Este ejemplo ilustra un modo de realización preferente de los ensayos de proximidad de la invención, también
 conocido como inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER). Los ensayos de proximidad de
 este modo de realización usan una plataforma basada en una micromatriz de anticuerpos que mide la expresión y la
 activación de proteínas objetivo en células tumorales circulantes (CTC) y/o en muestras de tejido (p. ej., BAAF).
 Como ejemplo no limitante, se pueden usar los ensayos de proximidad de este modo de realización para analizar el
 35 nivel de expresión de la proteína y/o el estado de activación de una o más proteínas objetivo tales como HER1 en
 CTC o tejido tumoral. En algunos casos, los ensayos de proximidad de este modo de realización utilizan CTC
 aisladas a partir de aproximadamente 7,5 ml de sangre entera mediante partículas magnéticas recubiertas con
 anticuerpos anti-Ep-CAM usando el identificador de CTC (Veridex). Después, se pueden estimular las CTC con
 factores de crecimiento (p. ej., EGF + herregulina) antes del inmunoanálisis de la activación y/o la expresión
 40 posteriores de la ruta de ErbB. En otros casos, los ensayos de proximidad de este modo de realización utilizan
 muestras de tejido tumoral, incluidas piezas de biopsia de metástasis congeladas inmediatamente después la
 extracción tales como, p. ej., muestras de cáncer de mama triple negativo.

45 En determinados casos, los ensayos de proximidad de este modo de realización usan un formato de portaobjetos e
 incluyen varios calibradores y controles. La figura 1 muestra los diseños de matriz de formatos de portaobjetos
 ejemplares para analizar los niveles de HER1 y HER2 totales y fosforiladas. En cada portaobjetos hay 16
 almohadillas con espacio para 300 manchas en cada almohadilla. Se usó una impresora de micromatrices por
 contacto para imprimir los portaobjetos de nitrocelulosa de 16 almohadillas. Cada mancha incluye un tinte de
 seguimiento y un anticuerpo (Ac) de captura específico o controles impresos por triplicado en diluciones seriadas.
 50 Los Ac de captura se imprimen a 1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml. Se imprimió IgG purificada como referencia de
 orientación tanto en el ensayo total como en el fosfo. Se imprimió BSA-fosfo como control de reactivo. Se realizan
 reacciones analíticas de calibrado en 8 almohadillas y reacciones de control de calidad interno en 2 almohadillas.
 Cada portaobjetos permite procesar hasta 4 muestras de pacientes desconocidas. La expresión de las proteínas
 objetivo totales o de las proteínas fosforiladas activas se puede comunicar como unidad estimada (UE), una unidad
 55 basada en el cálculo a partir de curvas de calibrado de lisado diluido de líneas celulares positivas que expresan la
 proteína de interés. Para cada muestra se usan dos portaobjetos distintos; un portaobjetos para detectar la
 expresión de las proteínas objetivo en células aisladas a partir de sangre entera ("portaobjetos de ensayo total") y el
 otro para la detección de fosforilación para detectar el grado de activación de la proteína objetivo ("portaobjetos de
 ensayo fosfo").

60 En un modo de realización, se recoge sangre entera de pacientes y de individuos sanos de control en tubos con
 EDTA. Con el fin de evitar la contaminación con células de la piel durante la extracción de sangre, los
 procedimientos estipulan que se descarten los primeros 3 ml de sangre recogida (o que se recojan en tubos
 CellSave para los recuentos de CTC y la inmunotinción visual usando el kit CellSearch). Después, se usan dos tubos
 65 con EDTA adicionales para recoger 7,5 ml de sangre entera en cada tubo. Después, se aíslan CTC a partir de cada
 tubo usando un dispositivo automático de separación magnética de células (AutoPrep Veridex). Se combinan las

muestras enriquecidas y después se estimulan con factores de crecimiento. Después, se lisan las células activadas y se procesan inmediatamente o se almacenan a -80 °C para un inmunoanálisis posterior. En otro modo de realización, se obtienen células de tejido tumoral, tales como piezas de biopsia de metástasis congeladas inmediatamente después de la extracción, se lisan para producir un extracto celular y después se procesan de inmediato o se almacenan a -80 °C para un inmunoanálisis posterior.

Los ensayos de proximidad de este modo de realización se inician con la incubación de objetivos proteínicos en lisados celulares con anticuerpos de captura sobre la superficie de una inmunomatriz. Todas las HER1 u otras RTK o proteínas de rutas de transducción de señales de los lisados celulares se unen a sus anticuerpos de captura correspondientes y, posteriormente, dos anticuerpos detectores adicionales forman inmunocomplejos exclusivos. Uno de los anticuerpos detectores se conjuga con glucosa oxidasa (GO) y genera H₂O₂ en presencia de glucosa. Cuando el segundo anticuerpo detector conjugado con HRP se une próximo al inmunocomplejo, se genera una señal positiva. El procedimiento posterior de amplificación de la señal mediado por tiramida potencia la sensibilidad del ensayo. La especificidad de la detección de proteínas se potencia con la unión concurrente de tres Ac específicos a diferentes epítopos y, debido a la amplificación, la sensibilidad puede ser tan elevada como para una sola célula. La figura 2 muestra un esquema de un ensayo de proximidad ejemplar para detectar HER1 fosforilada.

La plataforma de micromatrices descrita en el presente documento ofrece el beneficio de la multiplicación. La posibilidad de expandir el ensayo permite un análisis de alto contenido con la medida de varios receptores y moléculas de señalización de una muestra disponible limitada. La escala de la micromatriz se puede aumentar y puede alcanzar el rendimiento necesario para un ensayo de diagnóstico clínicamente útil.

Ejemplo 2. La expresión de EGFR y VEGFR2 predice la respuesta a la quimioterapia con nab-paclitaxel (nabP)/carboplatino (C)/bevacizumab (B) en cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNM)

Antecedentes

Los pacientes con cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNM), en el que el cáncer no muestra expresión de receptores de estrógenos, progesterona o del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), se enfrentan a un mal pronóstico (Dent, R. et al., *Clin Cancer Res.* 13(15 Pt 1):4429-4434 (2007)). En este contexto, se necesitan mejores tratamientos y marcadores pronósticos.

Las combinaciones de B (bevacizumab; Avastin®) y C (carboplatino) son activas en muchos tumores sólidos, incluido el CMTNM. El nab-paclitaxel (nabP; Abraxane®) se dirige potencialmente a SPARC, una proteína de unión a albúmina que secretan los tumores.

Las quimioterapias a base de taxano y platino tienen una actividad significativa en el tratamiento de primera línea del cáncer de mama metastásico y son particularmente eficaces cuando se dan en combinación (Perez, E. A., *Oncologist* 9(5):518-527 (2004); Perez, E. A. et al., *Oncology* 69(2): 117-121 (2005); O'Shaughnessy J., *Oncologist* 10 (supl. 3):20-29 (2005)).

El paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (nab) presenta un aumento de la eficacia y la tolerabilidad en comparación con el paclitaxel ordinario (Gradishar, W. J. et al., *J Clin Oncol.* 23(31):7794-7803 (2005)).

Entre los agentes de platino, el carboplatino parece tener una eficacia similar y se tolera mejor que el cisplatino cuando se combina con un taxano, con un riesgo menor de toxicidad no hematológica, aunque con un riesgo algo mayor de toxicidad hematológica (Gainford, C. et al., *Proc Am Soc Clin Oncol.* 19:113, resumen 439 (2000); Perez, E. A. et al., *Cancer* 88(1):124-131 (2000); Perez, E. A. et al., *Oncology* 69(2): 117-121 (2005)). La incidencia de neutropenia se reduce cuando el carboplatino se combina con paclitaxel en lugar de docetaxel (Perez, E. A. et al., *Cancer* 88(1):124-131 (2000); Perez, E. A. et al, *Oncology* 69(2): 117-121 (2005)).

El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que se dirige al factor de crecimiento de endotelial vascular (VEGF) para inhibir la angiogénesis. La adición de bevacizumab a la quimioterapia a base de taxano mejora significativamente los índices de respuesta al tratamiento y la supervivencia sin progresión (SSP) en mujeres con cáncer de mama metastásico (Miller, K. D. et al., *N Engl J Med.* 357(26):2666-2676 (2007); Miles, D. W. et al., *Cancer Res.* 69(24S):495s, resumen 41 (2009); Robert, N. J. et al., *JClin Oncol.* 27(15 supl.):42s, resumen 1005 (2009)).

Objetivo

En este estudio se usaron piezas de biopsia de metástasis (bxs) de participantes con CMTNM sin tratar para (1) describir la expresión/activación de las rutas de señalización en el CMTNM y (2) correlacionar estos patrones de expresión en el CMTNM con la respuesta.

Procedimientos

Se usaron piezas de biopsia de metástasis congeladas inmediatamente después de la extracción obtenidas el comienzo del ensayo para evaluar la expresión y la activación de proteínas de rutas de señalización (p. ej., HER1 (EGFR), HER2, HER3, receptor del factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF1-R), c-KIT, c-MET, PI3K, AKT, MAPK y/o VEGFR2). Se usó una plataforma de ensayo de proximidad tal como CEER para determinar la expresión y la activación integrales de proteínas de la ruta. Se usó la prueba del orden logarítmico para probar la asociación entre la supervivencia sin progresión (SSP) y la expresión o activación proteínica de las proteínas de la ruta. Las muestras de tejido tumoral usadas en este estudio se obtuvieron de un ensayo clínico en marcha titulado "A Phase II Study of Abraxane®, Carboplatin and Bevacizumab [triplet therapy] in 'Triple Negative' (Demonstrating No Expression for Estrogen, Progesterone, o Her2 Receptors) metastásic breast cancer" con el siguiente identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00479674.

Resultados

Se expresaba EGFR total en 11/18 (61 %) de las piezas de biopsia, pero estaba activado en 3/18 (17 %). PI3K y AKT estaban sobreexpresadas en 11/18 (61 %) y en 8/18 (44 %) pacientes, respectivamente, y se coexpresaban en 6/18 (33%) piezas de biopsia. En 17 piezas de biopsia de metástasis, se observaba una expresión de EGFR total mayor (33 semanas frente a 22 semanas, p=0,14) y una expresión más baja de VEGFR2 (33 semanas frente a 18 semanas, p=0,16). Todas las medidas se realizaron por CEER.

Conclusiones

El Nab-paclitaxel/carboplatino/bevacuzimab ofrece un tratamiento bien tolerado y eficaz para el CMTNM. La sobreexpresión de EGFR total y los niveles más bajos de VEGFR2 ofrecen un valor pronóstico para la respuesta al tratamiento triple en el CMTNM. Las biopsias metastásicas en tiempo real indican que se producen cambios importantes entre los tumores primarios y los metastásicos y que estos cambios tienen una gran influencia en la definición de los marcadores pronósticos de la respuesta para el CMTNM.

Ejemplo 3. Identificación integral de rutas para predecir la respuesta al tratamiento que contiene carboplatino (C) y bevacuzimab (B) en el cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNM).

Antecedentes: En el CMTNM, se necesitan mejores tratamientos y marcadores pronósticos. Las combinaciones de B (Avastin) y C (carboplatino) son activas en muchos tumores sólidos, incluido el CMTN. En este estudio se usaron piezas de biopsia (bx) de metástasis y de localizaciones primarias archivadas de CMTNM sin tratar (1) para determinar el nivel de expresión de VEGFR2 en cáncer de mama triple negativo primario y metastásico, (2) para describir la expresión/activación de proteínas de diversas rutas de señalización del CMTNM y (3) para correlacionar estos patrones de expresión del CMTNM con la respuesta.

Procedimientos: Se recogieron piezas de biopsia con aguja gruesa de cáncer de mama triple negativo y se congelaron adecuadamente a -80 °C. Se aplicó un procedimiento de inmunoensayo novedoso para estudiar los niveles de expresión y el grado de activación de proteínas de señalización en de 1000 ng a 5000 ng de tejidos congelados. La plataforma de CEER (también conocido como COPIA) es una plataforma de inmunomicromatrices múltiple que utiliza la formación de un inmunocomplejo exclusivo que requiere la colocalización de dos anticuerpos detectores para canalizar los acontecimientos para la generación/amplificación de la señal que dan lugar a una sensibilidad analítica y una especificidad extremadamente altas.

Resultados: En este estudio se identificaron grados variables de valores de CK en cada muestra (desde aproximadamente 3 hasta 1000 células tumorales/de 1000 ng a 5000 ng de lisado celular). En estos CMENM, los niveles de expresión de HER2 variaban de bajos a moderados (0 a 2+, equivalente IHQ) y se observaron en 17 de 18 muestras. Una de cada 18 muestras presentaba niveles de expresión de HER2 sustancialmente altos (IHQ nivel 3+). El 50 % de las muestras no mostraba fosforilación de HER2, mientras que el otro 50 % mostraba niveles variables de HER2 activada. También se analizó la prevalencia de la expresión/activación de HER1, HER3, IGF1-R, c-KIT, c-MET, PI3K, Shc, VEGFR2 y AKT en estas muestras.

Conclusión: Las biopsias metastásicas en tiempo real indican que se producen cambios importantes entre los tumores primarios y los metastásicos y que estos cambios tienen una gran influencia en la definición de los marcadores pronósticos de la respuesta. La sobreexpresión de EGFR total y activada y los niveles más bajos de VEGFR2 ofrecen un valor pronóstico para la respuesta al tratamiento triple (B+C+nab-paclitaxel) en el CMTNM. Como es frecuente que el perfil de la enfermedad se desplace, resultará útil realiza un seguimiento de las modificaciones de las proteínas de las rutas de transducción para ajustar el tratamiento.

Ejemplo 4. Identificación funcional de varias proteínas de rutas de señalización en pacientes con cáncer de mama

Resumen

Uno de los mecanismos de la resistencia *de novo* o adquirida es la expresión de diversas formas de receptores HER2/ERBB2 truncados ("t-ERBB2") sin dominios aminoterminales extracelulares. Los ejemplos no limitantes de isoformas de t-ERBB2 incluyen p110, p95HER2 (p95m), p95c y p95n. Los procedimientos para identificar diversas formas de receptores HER2 y otras tirosina cinasas receptoras (RTK) con posibilidad de transactivación en tumores primarios y metastásicos pueden proporcionar una percepción valiosa en los cambios de la patogenia de la enfermedad. Este ejemplo describe la identificación exitosa de un conjunto de proteínas de rutas de transducción de señales por su expresión y activación en 230 cánceres de mama con diversos estados de ER/PR/HER2. En particular, se estudiaron los niveles de especies de t-ERBB2 total y fosforilada en muestras de tumor de mama humana usando el procedimiento novedoso de inmunomicromatrices mediado por proximidad descrito en el presente documento. Este ejemplo muestra que se detectaron isoformas de t-ERBB2 en tumores fuertemente positivos para ERBB2 (16 de 31 muestras, 52 %) y que estaban fosforiladas en 10 de 38 muestras (32 %).

Introducción

Se ha informado de varios mecanismos para la resistencia al trastuzumab. Principalmente, se ha informado frecuentemente de la activación de otras RTK (tal como IGF1-R) y de la acumulación de formas truncadas de HER2, entre otros mecanismos. En particular, es frecuente encontrar los fragmentos carboxiloterminales de HER2 truncadas en el extremo aminoterminal, conocidos en su conjunto como p95HER2, en tumores y líneas celulares de cáncer de mama que expresan HER2. El cruce de señales entre diversas rutas de transducción de señales y los bucles de retroalimentación proporcionan mecanismos de escape para tumores bajo determinada presión terapéutica o dependencia de rutas y requiere una herramienta de diagnóstico integral para realizar un "análisis de la red de rutas". Las decisiones sobre el tratamiento realizadas con base en la información clínica obtenida por medio de la tecnología actual basada en IHQ/FISH realizada para unos pocos biomarcadores seleccionados no serán eficaces para tratar a pacientes con una enfermedad heterogénea de evolución rápida. Este ejemplo demuestra que una configuración diferente de los anticuerpos de detección permite la detección diferencial de objetivos truncados (p. ej., p95HER2) y de sus equivalente de longitud completa (p. ej., HER2). En particular, este ejemplo ilustra el uso de un formato novedoso de micromatrices de anticuerpos muy específico y sensible, el inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER), para cuantificar los niveles de especies de t-ERBB2 total y fosforilada en muestras humanas, tanto en tejido congelado de forma ultrarrápida como en aspiración con aguja fina de tumores metastásicos. Este ejemplo muestra además un análisis del estado funcional (expresión y activación) de HER2, p95HER2, HER1, HER3 e IGF1R, así como las proteínas de transducción de señales posteriores PI3K, Shc y c-MET.

Procedimientos

Impresión de micromatrices múltiples: Se imprimieron anticuerpos de captura (Ac) sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con nitrocelulosa (ONCYTE®, Grace Bio-Labs) usando impresoras que no eran de contacto (Nanoplotter, GeSiM). El diámetro de la manchas era de aproximadamente 175 µm y se guardaron los portaobjetos se guardaron en una cámara desecada a 4 °C. Todas las manchas incluían un tinte de seguimiento y Ac de captura específicos. Se imprimieron aproximadamente 500 pl de Ac de captura por triplicado a una serie de dilución de concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml. Se imprimieron IgG de ratón purificadas como control negativo. Cada portaobjetos contiene controles de línea celular para generar curvas de calibrado para la cuantificación precisa de las muestras de cada ciclo del portaobjetos. Se realizan controles de calidad internos en cada portaobjetos para garantizar la calidad de los datos generados a partir de cada portaobjetos-matriz.

Conjugación y purificación de anticuerpos: Se activaron Ac específicos de objetivo y las enzimas detectoras correspondientes con un entrecruzador bifuncional, succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), y se acoplaron con dextrano para preparar conjugados poliméricos de anticuerpo-dextrano-enzima. Se purificó el conjugado por HPLC usando una columna de exclusión por tamaño. Se detectaron las actividades de los Ac en los conjugados purificados por ELISA de competición y se detectó la actividad enzimática con un ensayo funcional específico para cada enzima detectora.

Inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER): Como se representa en la figura 3, las proteínas objetivo presentes en lisados tisulares se unen a anticuerpos de captura específicos impresos sobre la superficie de nitrocelulosa y las proteínas que no son objetivo no unidas se retiran del portaobjetos. La interacción enzimática entre un anticuerpo detector frente a un epítipo alterno sobre una proteína objetivo capturada conjugado con glucosa oxidasa (GO) y el otro anticuerpo detector específico para un sitio fosforilado de la proteína objetivo u otro epítipo no solapante conjugado con HRP da lugar a la generación de una señal y la posterior amplificación de la señal mediada por tiramida. En particular, se aclararon los portaobjetos con inmunomicromatrices 2 veces con TBST (Tris 50 mM/NaCl 150 mM/ Tween-20 al 0,1 %, pH 7,2-7,4), se bloquearon con 80 µl de tampón de bloqueo de Whatman durante 1 h a TA y después se lavaron 2 veces con TBST. Se añadieron controles de lisado celular diluido en serie en 80 µl de tampón de dilución (BSA al 2 %/ Triton X-100 al 0,1 %/TBS, pH 7,2-7,4) y muestras a las submatrices y se designaron como patrones sobre el portaobjetos, después se incubaron durante 1 hora a TA. Después de la incubación, se lavaron los portaobjetos 4 veces, 3 min cada vez. Se añadieron los Ac detectores en

80 µl del tampón de reacción y se incubaron durante 2 horas a TA. Una vez retirados los Ac detectores secundarios no unidos por lavado con TBST, se añadieron 80 µl de biotina-tiramida (400 µg/ml en etanol, Perkin Elmer Life Science) a 5 µg/ml en glucosa/PBS 50 mM y se incubó durante 15 min en la oscuridad. Se finalizó el procedimiento de ampliación de la señal mediada por tiramida canalizada por GO-HRP mediante lavado con TBST 4 veces durante 3 min cada vez. Se detectó el depósito local de biotina-tiramida por la adición de estreptavidina (SA)-Alexa647 (en PBS, Invitrogen) a 0,5 µg/ml (dilución 1:4000) en BSA al 2 %/Triton al 0,1 %/TBS durante 40 min. Después de completar la incubación, se lavaron los portaobjetos 4 veces con TBST, se secaron y se guardaron en oscuridad hasta que se escanearon en el escáner de micromatrices.

Enriquecimiento en tErbB2 (p. ej., p95HER2): Se retiraron los receptores p185-ErbB2 de longitud completa de los lisados celulares usando anticuerpos con marcaje magnético específicos para el dominio extracelular (DEC) de ErbB2. El lisado celular resultante del que se ha eliminado p185-ErbB2 contiene proteínas receptoras t-ERBB2 que carecen del DEC y se realizaron análisis posteriores para cuantificar el nivel de expresión y el grado de activación de t-ERBB2.

Muestras clínicas: Los tejidos de cáncer de mama congelados de forma ultrarrápida se adquirieron de ILSBio. Todos los pacientes eran de raza blanca y con carcinoma ductal de estadio II o III. Se disponía del estado IHQ de ErbB2 para todas las muestras. Se lisaron las muestras de tejido congeladas de forma ultrarrápida en 100 µl de tampón de lisis. Las muestras lisadas se mantuvieron en hielo 30 min y se centrifugaron. Se determinaron las concentraciones de proteínas de los sobrenadantes con el kit de ensayo de proteínas de cáncer de mama (Pierce) y se almacenaron los lisados celulares resultantes a -80 °C antes del análisis posterior. Se recogieron muestras de AAF de pacientes con cáncer de mama progresivo medible metastásico en estadio IIIB o estadio IV y que estaban a punto de comenzar un tratamiento sistémico. Los pacientes tenían cáncer de mama invasivo confirmado por histología o citología. Las muestras de AAF se recogieron usando agujas de calibre G23. Las muestras de AAF se inyectaron inmediatamente en viales de recogida que contenían tampón de lisis y se enviaron durante la noche para su análisis posterior.

IP-transferencia de bandas Western: Se incubaron los lisados celulares con perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos frente al DIC de ERBB2 durante la noche en un oscilador a 4 °C. Se resuspendieron los lisados con enriquecimiento inmunomagnético en tampón de muestras que contenía β-mercaptoetanol, se llevó a ebullición durante 5 min, se enfrió hasta TA y se cargó en un gel de NuPage (Invitrogen) al 4-12 %. Una vez completado, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa, después se lavaron, se bloquearon con leche Blotto al 5 % y se incubaron con el 1^{er} Ac y después con el 2^o antes del procedimiento de detección con NBT/BCIP.

Análisis de datos de CEER: Se escaneó cada portaobjeto en entornos de ganancia de tres fotomultiplicadores (PMT) para aumentar el intervalo dinámico eficaz. Se realizó el promedio de las intensidades de la señal con corrección de fondo para las manchas duplicadas impresas por triplicado. Se restó de cada muestra el valor de la fluorescencia relativa del blanco del reactivo correspondiente. Se usaron varios criterios de calidad para filtrar datos de otros análisis que incluían los límites de la huella de la mancha, el coeficiente de variación para los duplicados de las manchas, el fondo total de las almohadillas y la intensidad del blanco del reactivo. Para cada ensayo, se generó una curva de calibrado a partir de lisados celulares diluidos en serie preparados a partir de células BT474. Se ajustaron los datos a una ecuación de cinco parámetros derivada como una función de la concentración de anticuerpo de captura y PMT. Se representó gráficamente cada curva como una función del logaritmo de la intensidad de la señal, medida como unidad de fluorescencia relativa (UFR), frente al logaritmo de la concentración y se empleó como referencia la línea celular patrón, BT474. Se realizó el promedio de las predicciones individuales de cada dilución y ganancia en una sola predicción final.

Resultados

Expresión de t-ERBB2s en células humanas y tumores Para evaluar los niveles y la activación de las isoformas de ERBB2 en células humanas y muestras de tumores, se empleó CEER, una plataforma novedosa de inmunomicromatrices basada en anticuerpos de captura y proximidad (figura 3). El CEER requiere la formación de un inmunocomplejo entre el anticuerpo de captura específico de objetivo y dos anticuerpos detectores adicionales. Uno de los anticuerpos detectores está conjugado con glucosa oxidasa (GO) y el otro está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Los anticuerpos detectores se pueden unir a dos epítomos diferentes cualesquiera (lo que determinan el nivel de expresión del objetivo) o a un dominio fosforilado de la proteína capturada y a un epítomo alternativo (lo que determina el grado de activación del objetivo). Cuando a la GO del inmunocomplejo se le suministra un sustrato tal como la glucosa, genera peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que se canaliza hacia la HRP colocalizada, potenciando de este modo la sensibilidad analítica. Dado que la configuración del ensayo requiere la formación exitosa de un inmunocomplejo entre varios anticuerpos de captura/detectores, la plataforma proporciona la especificidad necesaria para el análisis simultáneo de varias proteínas objetivo. Como se muestra en la figura 4, este procedimiento puede detectar la ERBB2 total y fosforilada en líneas celulares BT474 con una sensibilidad analítica de una cifra. La comparación de la identificación diferencial de ERBB2 (con capturas de ERBB2-DEC y ERBB2-DIC) de células BT474 con y sin la eliminación de p185-ERBB2 de longitud completa, mostró

que había aproximadamente un 4,4 % de t-ERBB2 (o ~52800 tERBB2 receptores/célula) en esta línea celular de ERBB2 amplificada con aproximadamente $1,2 \times 10^6$ ERBB2 receptores/célula (figura 5).

5 Se puntuaron los niveles de ERBB2 en muestras congeladas de tumores de mama de 74 pacientes usando un análisis inmunohistoquímico y después se analizaron usando CEER (tabla 3). De las 74 muestras, 24 tenían ERBB2 baja/negativa (puntuación = 0-1 por IHQ), 19 tenían una expresión moderada de ERBB2 (puntuación = 2) y las 31 restantes tenían una expresión alta de ERBB2 (puntuación = 3). Según el análisis CEER, ninguno de los tumores con ERBB2 baja o negativa expresaba un nivel significativo de ERBB2 truncada, como se esperaba. Los niveles de ERBB2 y t-ERBB2 y t-ERBB2 fosforilada de cada muestra (mostrados en moléculas de RTK/célula con referencia a células BT474) se resumen en la tabla 2. Son embargo, el 10 % (2 de 19) tumores moderadamente positivos para ERBB2 expresaban t-ERBB2 y el 52 % (16 de 31) tumores fuertemente positivos para ERBB2 expresaban t-ERBB2. Además, las isoformas de t-ERBB2 estaban fosforiladas tanto en tumores moderadamente positivos para ERBB2 (10 %, 2 de 19 muestras) como en tumores fuertemente positivos para ERBB2 (32 %, 10 de 31). Se observaron muestras con niveles significativos de fosforilación de tERBB2 y niveles solamente moderados de t-ERBB2 (20330 y 24913), y esto es posible porque t-ERBB2 se puede activar a través de la interacción con RTK. Se proporcionan ejemplos de identificación de tumores CEER-ERBB2 y análisis de IP-transferencia de bandas Western de ERBB2 en la figura 6 (las muestras están subrayadas en la tabla 2) y en la figura 7 (las muestras están recuadradas en la tabla 2), respectivamente. Además, se analizaron AAF de sitios metastásicos de 8 pacientes con cáncer de mama. Tres muestras con enfermedad positiva para ERBB2 mostraron un grado variable de t-ERBB2 y t-ERBB2 fosforilada (tabla 3) muestras que las muestras de cánceres negativos para ERBB2 no mostraron expresión de t-ERBB2. En la identificación ampliada de RTK, se detectó la expresión de IGF1R y c-MET en 8C3-005-006, lo que puede ser la causa de un nivel más alto de pt-ERBB2 a pesar del nivel más bajo de t-ERBB2 entre las muestras de AAF positivas para ERBB2.

Tabla 1. Expresión y fosforilación de t-ERBB2 en tumores de mama humanos

25

IHQ	Puntuación de ERBB2 0/1	Puntuación de ERBB2 2	Puntuación de ERBB2 3
Nº de muestra	24	19	31
COPIA de t-ERBB2+	0	2	16
COPIA de t-ERBB2+	0	2	10
% de t-ERBB2+	0 %	11 %	52 %
% de t-ERBB2+	0 %	11 %	32 %

Tabla 2. Identificación de tejido de cáncer de mama con ERBB2.

Muestra	IHQ	P185HER2-T (RTK/célula)	tHER2-T (RTK/célula)	tHER2-P (pRTK/célula)	Muestra	IHQ	P185HER2-T (RTK/célula)	tHER2-T (RTK/célula)	tHER2-P (pRTK/célula)	Muestra	IHQ	P185HER2-T (RTK/célula)	tHER2-T (RTK/célula)	tHER2-P (pRTK/célula)
24315	3	1.253.211	31.342	247	21657	3	292.283	10.048	28	26814	1	313.244	2.861	72
20013	3	>2x10e6	74.298	150	22610	3	745.933	39.916	195	22392	1	291.607	3.481	35
25066	3	1.876.717	62.646	162	24720	3	511.344	28.431	524	22112	1	-	-	-
26110	3	>2x10e6	75.942	1.007	16775	3	664.308	36.527	397	24272	1	116.945	20.619	265
26115	3	>2x10e6	314.177	3.565	25058	3	655.416	86.973	5.506	19875	1	-	5.448	110
20250	3	1.108.050	41.569	81	19871	3	223.808	25.221	235	19924	1	-	4.123	15
24289	3	>2x10e6	52.315	297	22113	2	>2x10e6	66.497	724	20014	1	-	10.040	43
20012	3	1.840.292	75.450	1.289	ZCCFFAK4	2	433.513	13.476	136	26371	1	-	13.302	469
24300	3	1.501.949	154.422	371	26773	2	946.789	208.282	16.121	24914	1	-	-	-
20003	3	1.277.092	44.179	566	26780	2	538.384	7.338	-	24400	1	-	10.078	93
19730	3	1.753.386	126.745	390	24913	2	393.028	36.054	2.145	26776	1	-	346	-
OV8S1	3	937.546	25.552	41	25283	2	118.612	7.000	25	19826	1	-	21.840	75
20323	3	>2x10e6	107.288	6.464	24928	2	-	-	-	24931	1	-	8.054	95
20520	3	>2x10e6	113.161	3.687	26379	2	221.142	6.468	52	KW7VHAET	1	-	3.367	36
21704	3	1.520.673	48.669	93	WU018	2	314.653	17.864	47	NP11802	1	-	2.053	17
26811	3	>2x10e6	307.337	4.523	25882	2	219.387	3.026	39	19898	1	-	894	-
26106	3	>2x10e6	125.062	935	25798	2	137.399	10.424	248	21655	1	137.941	11.983	65
22080	3	1.340.073	142.055	2.215	24960	2	-	15.563	43	24676	1	-	2.905	-
19844	3	956.628	49.042	158	26154	2	110.091	3.511	111	9895	1	-	8.896	214
20371	3	>2x10e6	105.413	728	25061	2	-	8.993	105	19692	1	-	2.664	50
AUBBG	3	486.835	15.525	56	22176	2	-	3.788	95	17253	0	-	-	-
22715	3	1.148.445	58.781	3.467	21962	2	-	1.515	102	20007	0	-	5.536	52
21703	3	643.263	31.597	92	24708	2	-	4.769	16	21603	0	-	4.463	44
19927	3	1.452.313	91.566	563	20525	2	-	1.806	50	1R2117	0	-	-	66
20330	3	458.839	45.080	1.251	24916	2	-	2.224	15		0	-	-	-

Las imágenes de matrices CEER ilustrativas para las muestras subrayadas se muestran en la figura 6 y la IP-transferencia de bandas de tipo Western para las muestras recuadradas se muestran en la figura 7. Los valores de RTK/célula se determinan por comparación de la cantidad de muestras de entrada y la cantidad equivalente de células BT474 de referencia.

Tabla 3. Análisis de t-ERBB2 para muestras de AAF.

ID de la muestra	t-ERBB2 (RTK/célula)	Pt-ERBB2 (pRTK/célula)
8C3-002-001	57,341	3,062
8C3-005-006	26,989	5,309
8C3-005-007	50,741	5,204

Como se muestra en la figura 8, en 174 muestras de cáncer de mama se observó la expresión y la activación de proteínas de una amplia variedad de rutas. La muestra con la señal más alta para cada marcador se indica con el color más oscuro. El CEER-HER2 mostró una alta correlación con el estado de IHQ-HER2. El estado de HER2 discordante entre el CEER y la IHQ se resolvió por IP-transferencia de bandas Western y mostró una correlación de >98 %. El nivel de HER3-P mostró un grado de correlación alto con la activación de HER3-T y PI3K. El perfil de cMET también mostró una fuerte correlación con la activación de PI3K. El 27 % (12/45 de 2+ por IHQ) y el 21 % (11/53 de 0/1+ por IHQ) de los tejidos con cáncer de mama con niveles no sobreexpresados, pero sí significativos, de HER2 mostraron una fosforilación de más del 5 % del receptor HER2 expresado.

Conclusión

El estado de HER2 y sus formas variantes, así como otras RTK, proporciona información fundamental sobre los posibles mecanismos de los pacientes con cáncer de mama positivo para HER2 que no responden al trastuzumab debido a su resistencia primaria o adquirida. Se puede utilizar el análisis CEER descrito en el presente documento para identificar en pacientes con cáncer de mama las proteínas de transducción de señales para seleccionar un tratamiento dirigido adecuado.

Ejemplo 5. Identificación integral de rutas para predecir la respuesta al tratamiento en el cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNM).

En el CMTN, se necesitan mejores tratamientos y marcadores pronósticos. En este estudio se usaron piezas de biopsia con aguja gruesa de pacientes con cáncer de mama triple negativo tratados con B (Avastin® [bevacizumab]), C (carboplatino) y nabP (Abraxane®) ("tratamiento triple") para (1) determinar el nivel de expresión y el grado de activación de diversas proteínas de rutas de señalización en CMTNM (p. ej., VEGFR2, c-KIT, HER1, etc.) y (2) correlacionar estos patrones de expresión y activación del CMTNM con la respuesta.

Se recogieron piezas de biopsia con aguja gruesa de cáncer de mama triple negativo (n=17) obtenidas de pacientes antes de comenzar el tratamiento con B (Avastin® [bevacizumab]), C (carboplatino) y nabP (Abraxane®) y se congelaron adecuadamente a -80 °C. Se aplicó un procedimiento de inmunoensayo novedoso para estudiar los niveles de expresión y el grado de activación de proteínas de señalización en de 1000ng a 5000ng de tejidos congelados. El inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER) (también conocido como el inmunoensayo colaborativo de proximidad (COPIA)) como se describe en el presente documento es una plataforma de inmunomicromatrices múltiple que utiliza la formación de un inmunocomplejo exclusivo que requiere la colocalización de dos anticuerpos detectores para canalizar acontecimientos para lograr la generación/amplificación de la señal que da lugar a una sensibilidad analítica y una especificidad extremadamente altas. La figura 9 proporciona un ejemplo de identificación funcional de rutas por CEER en una muestra de cáncer de mama triple negativo obtenida por biopsia por punción con aguja gruesa en comparación con células de cáncer de mama T47D

de control y células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC). En particular, se evaluó por CEER la expresión y la activación de las siguientes proteínas de rutas de señalización en CMTNM: EGFR (HER1), HER2, HER3, c-Met, IGF-1R, c-KIT, PI3K, SHC, AKT y VEGFR2.

5 También se determinó la supervivencia sin progresión (SSP). Para cada marcador, se dividieron las muestras en grupos de "alto" y "bajo", con base en el valor de corte. Por ejemplo, se puede seleccionar el valor de corte en o próximo a la mediana para igualar los tamaños de los grupos (p. ej., 8=bajo, 9=alto). Se usó la prueba de la t paramétrica para correlacionar la expresión y la activación de las proteínas con la SSP. Se comparó la SSP para el grupo bajo (p. ej., por debajo de la mediana) frente al alto (p. ej., por encima de la mediana). La figura 10 ilustra los resultados de esta comparación entre la SSP de los grupos de muestras altas y bajas para cada marcador. En particular, la tabla de la figura 10 muestra que la expresión de c-KIT baja o de VEGFR2 baja se asocia con una duración significativamente más larga de la SSP en comparación con niveles más altos de ese marcador (42,1 semanas de SSP para niveles de c-KIT total bajos frente a 20,7 semanas de SSP para niveles de c-KIT total altos; 39,9 semanas de SSP para niveles de VEGFR2 total bajos frente a 20,9 semanas de SSP para niveles de VEGFR2 total altos). La tabla de la figura 10 también muestra que la activación de IGF-1R baja, la activación de c-KIT baja, la expresión de IGF-1R baja y la activación de HER1 baja se asociaban todas con una duración mayor de la SSP en comparación con los niveles más altos de ese marcador. Además, la tabla de la figura 10 muestra que la expresión de HER1 alta se asocia con una duración mayor de la SSP en comparación con niveles más bajos de ese marcador (36,8 semanas de SSP para niveles de HER1 total altos frente a 23,4 semanas de SSP para niveles de HER1 total bajos). La tabla de la figura 11 ilustra un análisis similar usando una prueba de Wilcoxon para datos independientes no paramétrica para correlacionar la expresión y la activación de las proteínas con la SSP. De nuevo, se demostró que la expresión de c-KIT o VEGFR2 baja se asociaba con una duración significativamente mayor de la SSP en comparación con niveles más altos de ese marcador.

25 La figura 12 muestra que medir los niveles de expresión tanto de c-KIT como de VEGFR2 aumenta el valor pronóstico de la determinación de la respuesta al tratamiento triple en el CMTNM. En particular, se observó que una combinación de niveles de expresión de c-KIT y VEGFR2 bajos ("ninguno alto") se asociaba con una duración significativamente mayor de la SSP en comparación con muestras en las que un marcador o ambos se mostraban altos ("uno alto" o "ambos altos").

30 La figura 13 muestra que medir los niveles de expresión tanto de VEGFR2 como de HER1 aumenta el valor pronóstico de la determinación de la respuesta al tratamiento triple en el CMTNM. En particular, se observó que una combinación de niveles de expresión de HER1 alto y VEGFR2 bajo ("ninguno malo") se asociaba con una duración significativamente mayor de la SSP en comparación con muestras en las que la expresión de HER1 era baja y/o la expresión de VEGFR2 era alta ("uno malo" o "ambos malos").

35 La figura 14 ilustra la correlación entre el aumento de los niveles de (A) VEGFR2 total, (B) c-KIT total y (C) HER1 total y la respuesta al tratamiento triple, como indica la duración de la SSP. En particular, los niveles de VEGFR2 o c-KIT totales más bajos se asociaron con la respuesta al tratamiento triple en el CMTNM, mientras que los niveles de HER1 total más altos se asociaron con la respuesta al tratamiento triple en el CMTNM.

40 En conclusión, este ejemplo demuestra que: (1) existe una correlación entre los niveles activados (fosfo) y totales tanto para c-KIT como para IGF-1R; (2) los niveles de expresión de VEGFR2 o c-KIT bajos predicen la respuesta; (3) los niveles de expresión de EGFR altos (p. ej., debería responder a tratamiento a base de platino) se correlacionan con la respuesta, mientras que los niveles de P-EGFR altos no lo hacen; (4) en general, si la activación de la ruta (p. ej., P-c-KIT, p-IGF-1R, p-EGFR, p-AKT y otras) es baja (p. ej., es tumor no es muy proliferativo), el paciente tiene una SSP mayor con tratamiento triple de carboplatino, nab-paclitaxel y Avastin; y (5) para tratamientos combinados, la suma de la expresión de VEGFR2 total y la expresión de c-KIT o EGFR totales da lugar a valores pronósticos mejores.

50 Ejemplo 6. Recogida y procesamiento de tejido tumoral

Se pueden obtener muestras de tejido tumoral o de AAF a partir de pacientes con cáncer para estudiar las rutas de transducción de señales usando los ensayos de proximidad descritos en el presente documento (p. ej., CEER). Por ejemplo, se pueden obtener muestras para analizar las rutas a partir de tejidos congelados, bien realizando secciones o bien realizando un procedimiento de BAAF en muestras congeladas. En determinados casos, se preparan secciones tisulares en muestras congeladas para su posterior análisis de identificación. En otros casos determinados, se realiza el procedimiento de BAAF relativamente no invasivo para obtener muestras de pacientes (e injertos) en un entorno clínico.

60 Se puede recoger muestras de tejido congeladas por los siguientes procedimientos:

Opción N° 1. Recogida de secciones tisulares:

65 1. Mantener un plato de pesada de plástico en hielo seco, en el que tendrá lugar el corte de la muestra.

ES 2 505 466 T3

a. Para enfriar los materiales, mantener en hielo seco las cuchillas ordinarias o las cuchillas del microtomo, las pinzas finas y los viales de recogida de muestras previamente etiquetados.

5 2. Tomar tejidos cancerosos humanos congelados del congelador a -80 °C y transferir las muestras inmediatamente al hielo seco.

10 3. Disponer el tejido congelado en el plato de pesada sobre hielo seco, cortar piezas pequeñas de tejido congelado (10 µm de sección x 3) usando una cuchilla ordinaria o una cuchilla de microtomo y transferir el tejido a un vial de recogida de muestras previamente etiquetado y previamente enfriado usando las pinzas previamente enfriadas.

4. Cerrar la tapa y mantenerlo en hielo seco.

15 5. Disponer las muestras recogidas en una bolsa de plástico doble en primer lugar y después en un recipiente de poliestireno Styrofoam (recipiente principal) con una cantidad de hielo seco adecuada.

a. Usar al menos 2,7-3,6 kg (6-8 libras) de hielo seco. Usar más en los meses de verano. NOTA: La cantidad exacta de hielo seco se determinará después de consultarlo con una empresa de transporte.

20 b. Consultar con una empresa de transporte los permisos y la documentación necesarios para un procedimiento de envío internacional.

c. No usar hielo húmedo o refrigerantes (es decir, bolsa de gel CoolPack).

25 6. Asegurarse de que se incluye la solicitud y la lista de muestras en la caja, pero fuera de la bolsa doble.

7. Cerrar de forma segura el recipiente y etiquetarlo como "Tejido congelado - No descongelar".

Opción N° 2. Preparación de BAAF a partir de tejidos congelados:

30 1. Tomar tejidos cancerosos humanos congelados del congelador a -80 °C y transferir los viales de muestras inmediatamente a hielo seco.

35 2. Se deberán disponer las muestras listas para el procedimiento de BAAF sobre hielo húmedo durante 10 minutos para ablandar el tejido.

3. La toma de muestras por BAAF se realizará pasando una aguja de calibre 23 o 25 a través de tejido congelado ablandado de 5 a 10 veces. Devolver el resto del vial de muestra al hielo seco.

40 4. Limpiar la tapa del vial recogida de muestras de BAAF con alcohol.

5. Los tejidos de BAAF congelados se recogerán por inyección directa en el vial de recogida con un contenido de 100 µl de "solución tardía de proteínas" (Prometheus Laboratories; San Diego, CA). Dispensar los materiales tisulares recogidos mezclando con suavidad el contenido.

45 6. Sujetar firmemente el vial de recogida de AAF con una mano y golpearlo rápidamente con los dedos (~15x) para garantizar la lisis de las células (agitar en vórtex durante 10 segundos, si es posible).

50 7. Disponer las muestras recogidas en una bolsa de plástico doble en primer lugar y después en un recipiente de poliestireno Styrofoam (recipiente principal) con CoolPacks.

a. Consultar con una empresa de transporte los permisos y la documentación necesarios para un procedimiento de envío internacional.

55 8. Asegurarse de que se incluye la solicitud y la lista de muestras en la caja, pero fuera de la bolsa doble.

9. Cerrar de forma segura el recipiente y etiquetarlo como "Muestra biológica".

Ejemplo 7. Análisis de datos para cuantificar de proteínas de rutas de transducción de señales en células cancerosas

60 Este ejemplo ilustra la cuantificación de los niveles de expresión y/o el grado de activación de uno o más analitos tales como una o más proteínas de transducción de señales en una muestra biológica (p. ej., sangre o tejido tumoral) frente a una curva de calibrado generada para el analito de interés en particular.

65 En algunos modos de realización, se escanea cada portaobjetos de CEER en entornos de ganancia de tres fotomultiplicadores (PMT) para mejorar la sensibilidad y reducir el impacto de la saturación. Se usa el programa

informático ScanArray Express de Perkin Elmer para encontrar las manchas y cuantificar las señales. Los identificadores para cada mancha se importan desde un archivo GenePix Array List (.gal). El número específico del estudio desidentificado para cada muestra clínica de un portaobjetos se incorpora en el conjunto de datos resultante.

5 En otros modos de realización, se realiza el promedio de las intensidades de señal con corrección de fondo para las manchas duplicadas impresas por triplicado. Se resta de cada muestra el valor de la fluorescencia relativa del blanco del reactivo correspondiente. Se usan varios criterios de calidad para filtrar datos de otros análisis que incluyan los límites de la huella de la mancha, el coeficiente de variación para los duplicados de las manchas, el fondo total de las almohadillas y la intensidad del blanco del reactivo.

10 Para cada ensayo, se puede generar una curva de calibrado sigmoidea a partir de varias (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, etc.) concentraciones de lisados celulares diluidos en serie preparados a partir de líneas celulares tales como MD-468 (positiva para HER1), SKBr3 (positiva para HER2), BT474 (positiva para HER2 y p95HER2), HCC827 (positiva para c-MET y HER1), T47D estimulada con IGF (positiva para IGF1R) y/o T47D estimulada con HRG (positiva para HER3). Se puede representar gráficamente cada curva como una función de la intensidad de la señal frente a unidades derivadas del logaritmo de la concentración, UE (unidad estimada). Se pueden ajustar los datos a una ecuación de cinco parámetros (5PL) por regresión no lineal (Ritz, C. y Streibig, J. C., J. Statistical Software, 12, 1-22 (2005)), ajustando simultáneamente las tres diluciones del anticuerpo de captura. El ajuste se lleva a cabo usando R, un paquete de programas informáticos estadísticos de código abierto (Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.R (2008)). Para evitar la parametrización excesiva del modelo matemático y, de este modo, mejorar la precisión, se pueden limitar cuatro parámetros, al mismo tiempo que se puede resolver cada dilución para un punto de inflexión individual. Este procedimiento se puede repetir para cada entorno de ganancia de PMT de 45, 50 y 60. Esto da lugar a nueve curvas de calibrado generadas por ensayo, a partir de tres diluciones de anticuerpo de captura y tres escaneos de PMT. La redundancia incorporada en el ensayo permite eliminar una o más de las combinaciones de dilución/escaneo si el ajuste de la curva de calibrado tiene una R^2 de menos de 0,95 y, por tanto, mejora las predicciones posteriores.

30 Cálculo de UE (basado en la curva de calibrado) - Se pueden combinar las predicciones individuales de cada una de las curvas de calibrado (p. ej., diluciones de 3 anticuerpos de captura y escaneo de 3 entornos de ganancia de PMT) en una única predicción final. Para cada predicción, se calcula la pendiente del punto en la curva de calibrado. Esta pendiente se lleva con unidades logarítmicas al eje x, es decir, las unidades del denominador de la pendiente son logaritmos de unidades estimadas (UE). En segundo lugar, se calcula un promedio ponderado de las predicciones, donde las ponderaciones se determinan a partir de la pendiente. Específicamente, se suman las ponderaciones y a cada punto se le da una ponderación igual a su pendiente dividida entre las pendientes totales. Se puede validar cada ensayo frente a predicciones para controles conocidos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la respuesta de un tumor de mama triple negativo al tratamiento con un fármaco antineoplásico, comprendiendo el procedimiento :
- 5 (a) lisar una célula tumoral obtenida del tumor de mama triple negativo para producir un extracto celular;
- (b) determinar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular; y
- 10 (c) comparar el nivel de expresión de VEGFR2 en el extracto celular determinado en la etapa (b) con un nivel de expresión de VEGFR2 de referencia,
- en el que la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo en comparación con la referencia es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico, en el que el fármaco antineoplásico es una
- 15 combinación de bevacizumab (Avastin®), carboplatino y paclitaxel.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende además determinar el nivel de expresión de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R en el extracto celular.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo, un nivel de expresión de HER1 alto y/o un nivel de expresión de IGF-1R bajo en el extracto celular en comparación con un nivel de expresión de c-KIT, HER1 o IGF-1R de referencia es un factor pronóstico de la respuesta al tratamiento con el fármaco antineoplásico.
- 25 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paclitaxel es paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (nab).
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de expresión de referencia se calcula con una curva de calibrado generada a partir de una línea celular cancerosa, generándose opcionalmente
- 30 dicha curva de calibrado a partir de varias concentraciones de un extracto celular diluido en serie preparado a partir de la línea celular cancerosa, expresando dicha línea celular cancerosa opcionalmente VEGFR2, c-KIT, HER1 y/o IGF-1R.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el procedimiento comprende además
- 35 determinar el grado de activación de VEGFR2, c-KIT, HER1, IGF-1R y/o AKT en el extracto celular.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento comprende además determinar el nivel de expresión y/o el grado de activación de una o más moléculas de transducción de señal adicionales del extracto celular.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que las una o más moléculas de transducción de señal adicionales se seleccionan del grupo que consiste en HER2, p95HER2, HER3, HER4, PI3K, AKT, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, P70S6K, GSK-3β, Shc, c-MET, VEGFR1, VEGFR3, un dímero receptor y combinaciones de las mismas.
- 45 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la célula tumoral es una célula tumoral en circulación o una célula obtenida por aspiración con aguja fina (AAF) a partir de un tumor de mama triple negativo.
- 50 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la célula tumoral se aísla a partir de una muestra, obteniéndose opcionalmente de un sujeto con cáncer de mama triple negativo metastásico, siendo dicha muestra opcionalmente sangre entera, suero, plasma o una muestra de tejido tumoral.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la presencia de un nivel de
- 55 expresión de VEGFR2 bajo es un factor pronóstico de una duración mayor de la supervivencia sin progresión (SSP).
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo y/o la presencia de un nivel de expresión de HER1 alto son factores pronósticos de una duración mayor de la SSP.
- 60 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la presencia de un nivel de expresión de VEGFR2 bajo en combinación con la presencia de un nivel de expresión de c-KIT bajo y/o un nivel de expresión de HER1 alto, es un factor pronóstico de una duración mayor de la SSP en comparación con el nivel de expresión de VEGFR2, c-KIT o HER1 por separado.
- 65

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la célula tumoral se ha puesto en contacto con fármaco antineoplásico antes de la etapa (a) *in vitro*.
- 5 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el nivel de expresión de VEGFR2 se determina mediante la detección de los niveles de proteína total de VEGFR2, o el nivel de expresión de VEGFR2 se determina con un ensayo de detección dual de proximidad, siendo, opcionalmente, dicho ensayo de detección dual de proximidad un inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER).
- 10 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, en el que el nivel de expresión de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R se determina mediante la detección de los niveles de proteína total de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R, o el nivel de expresión de c-KIT, HER1 y/o IGF-1R se determina con un ensayo de detección dual de proximidad, siendo opcionalmente dicho ensayo de detección dual de proximidad un inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER).

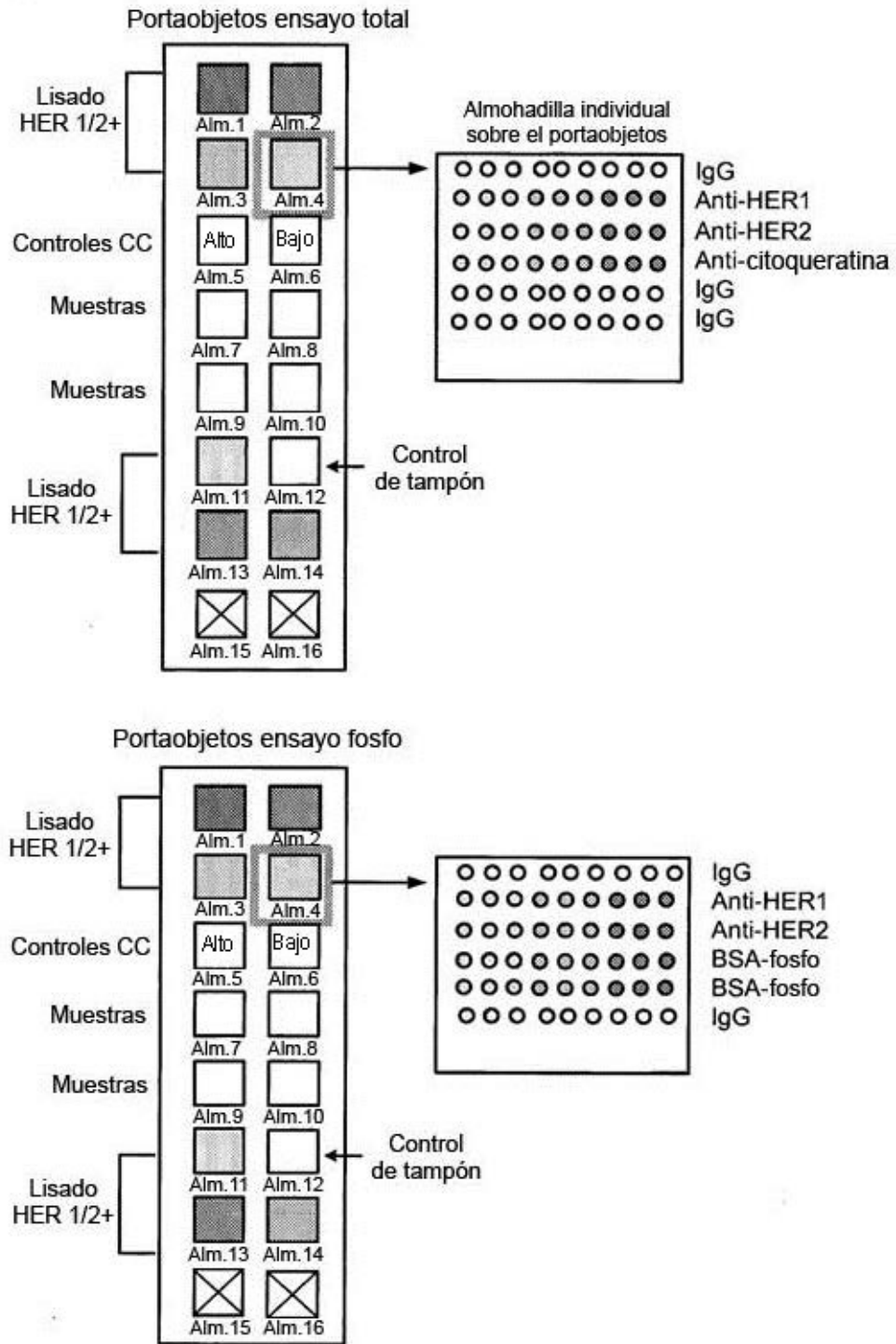


FIG. 1

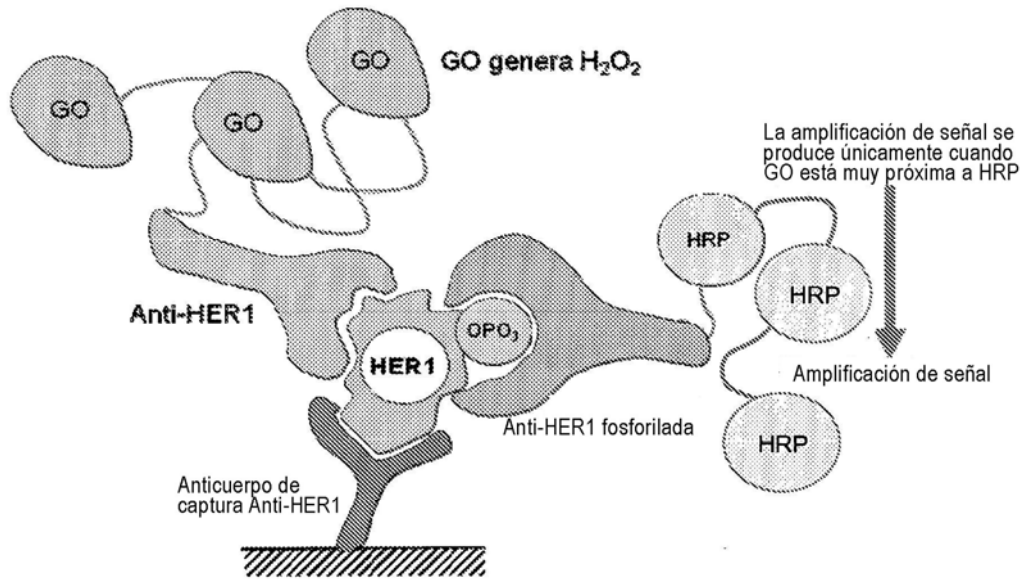


FIG. 2

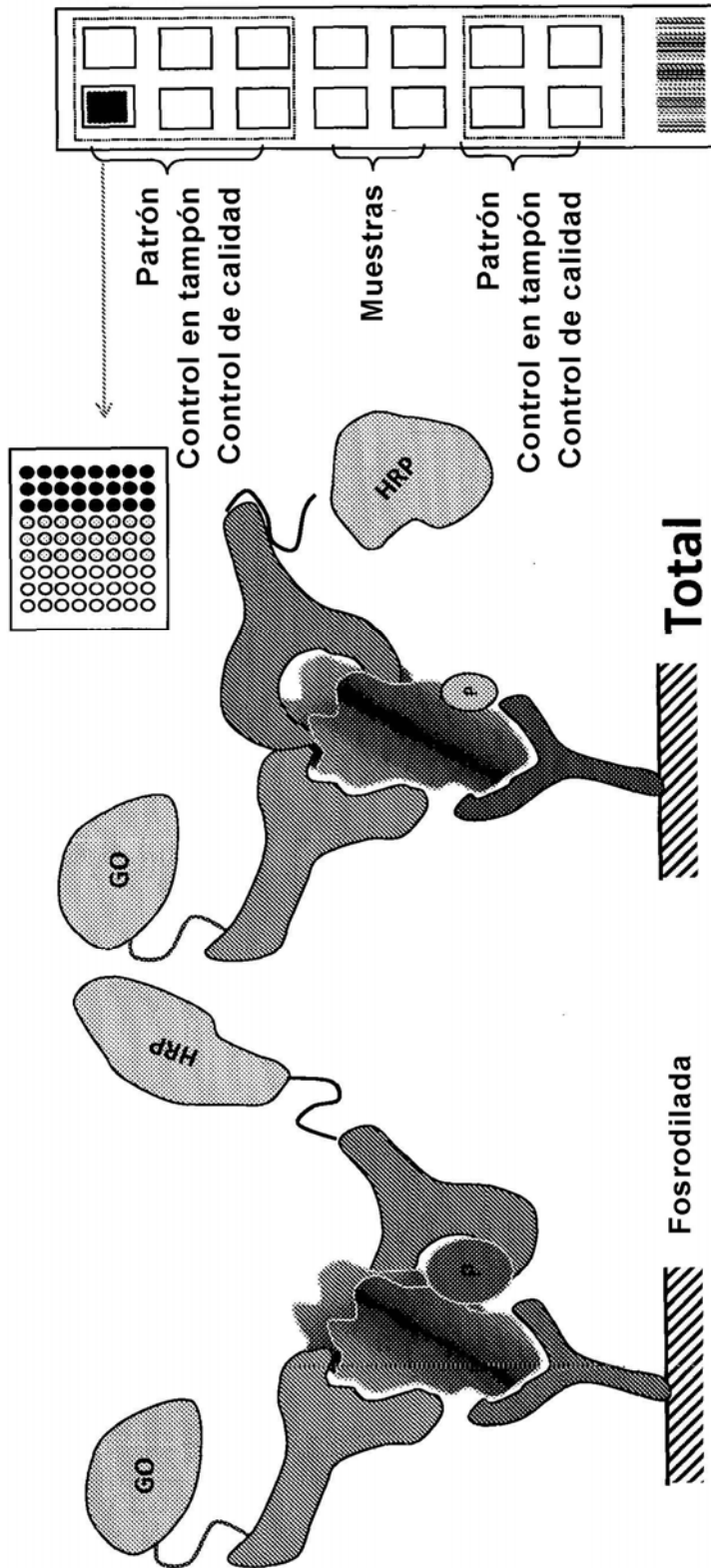


FIG. 3

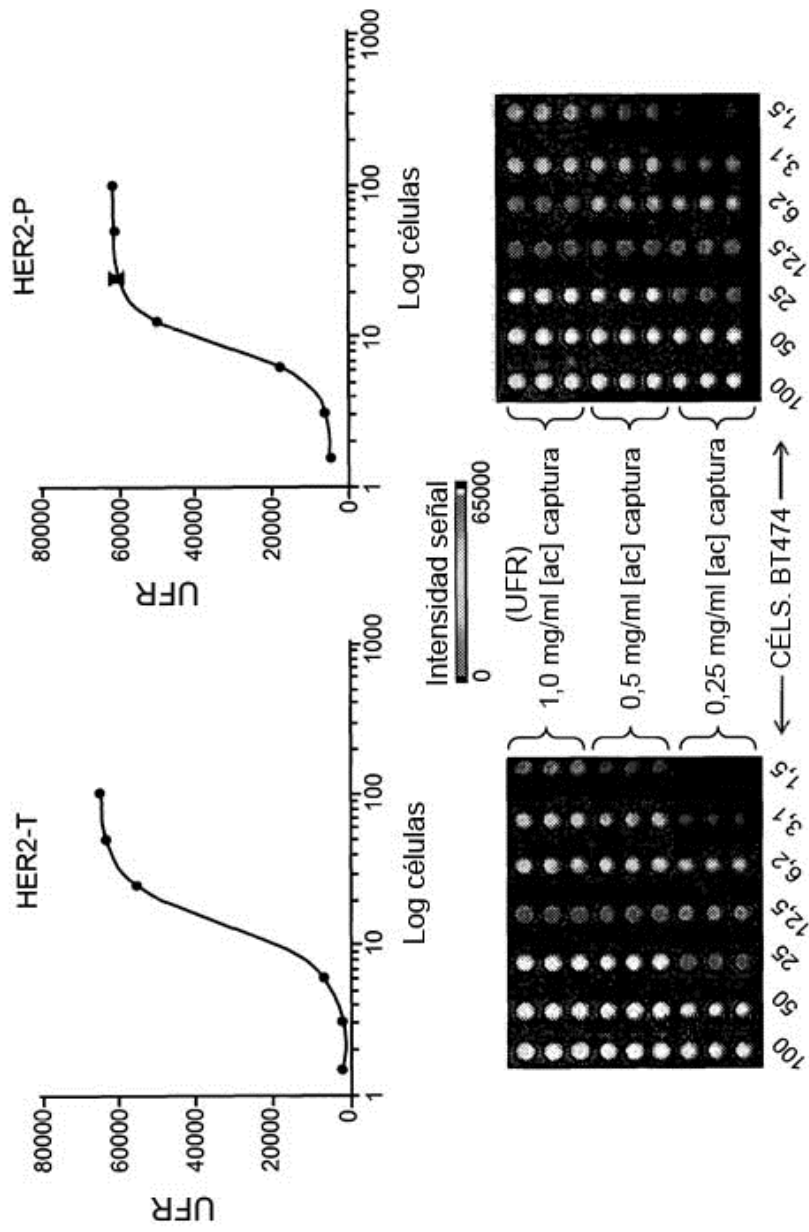


FIG. 4

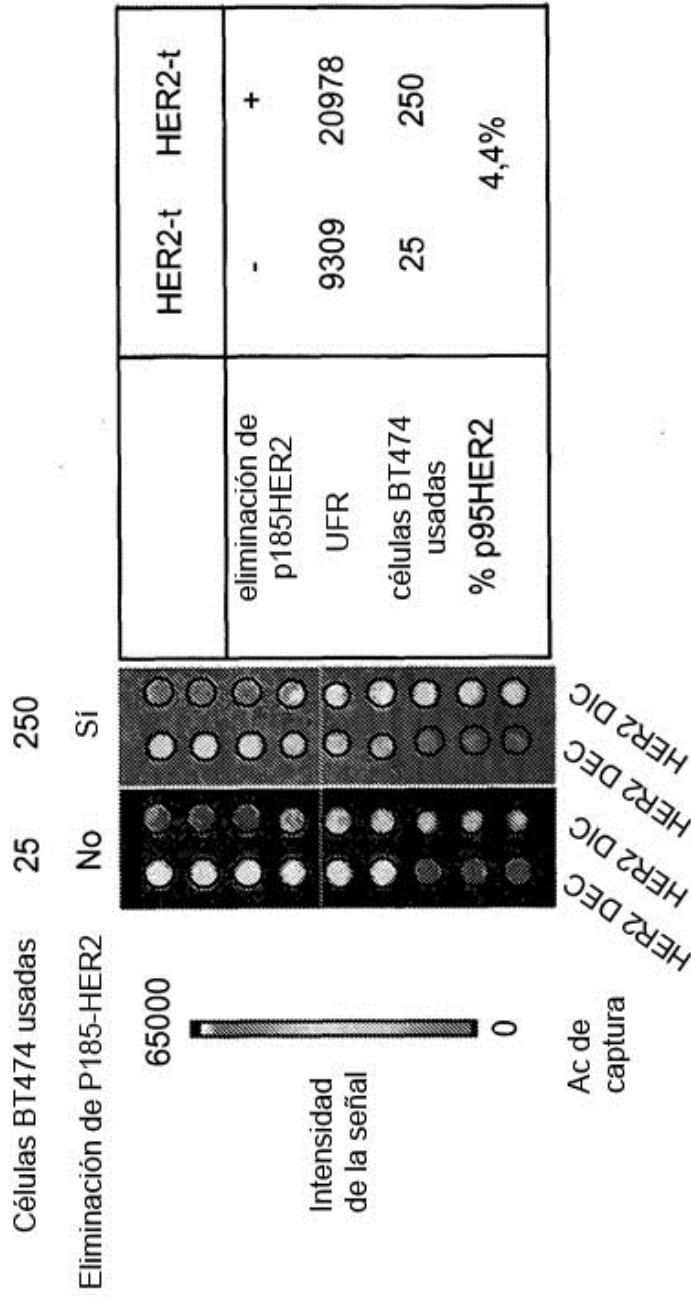


FIG. 5

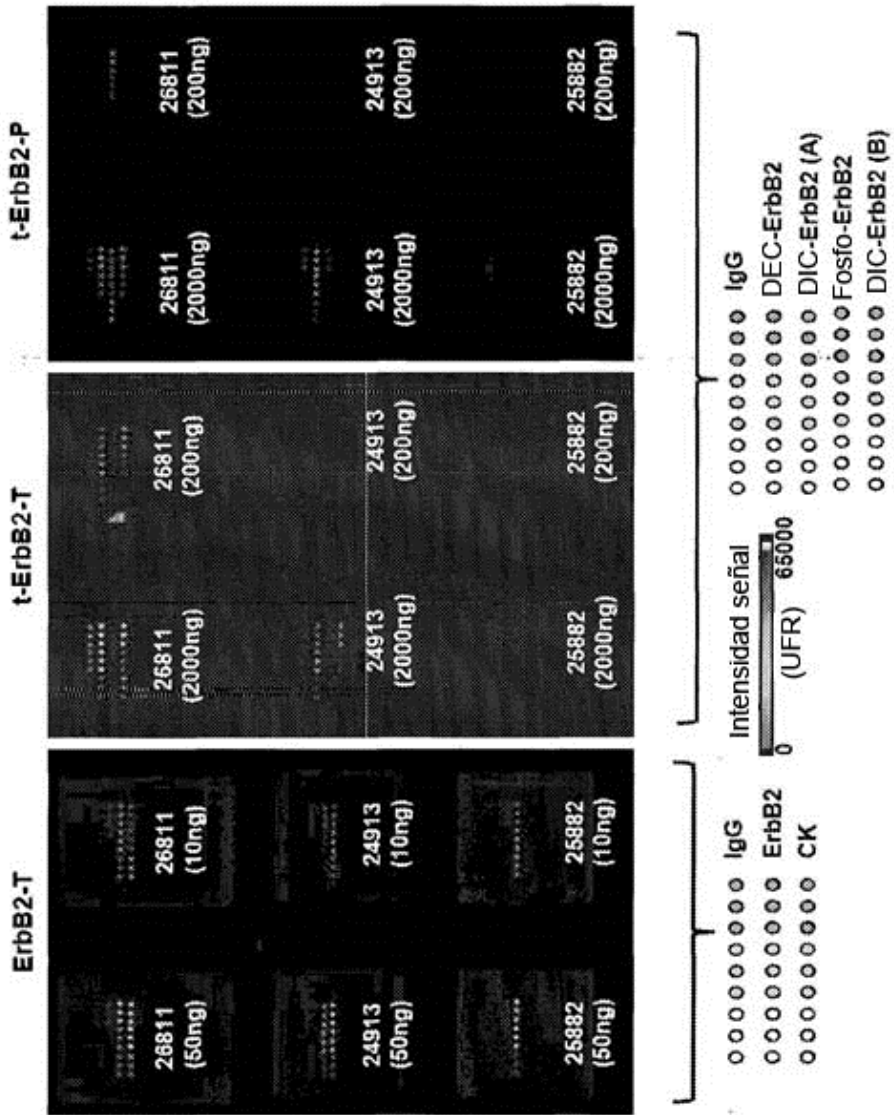


FIG. 6

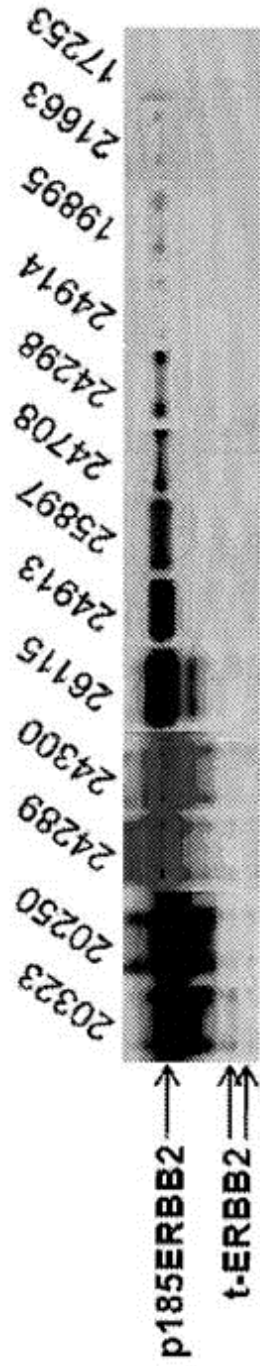
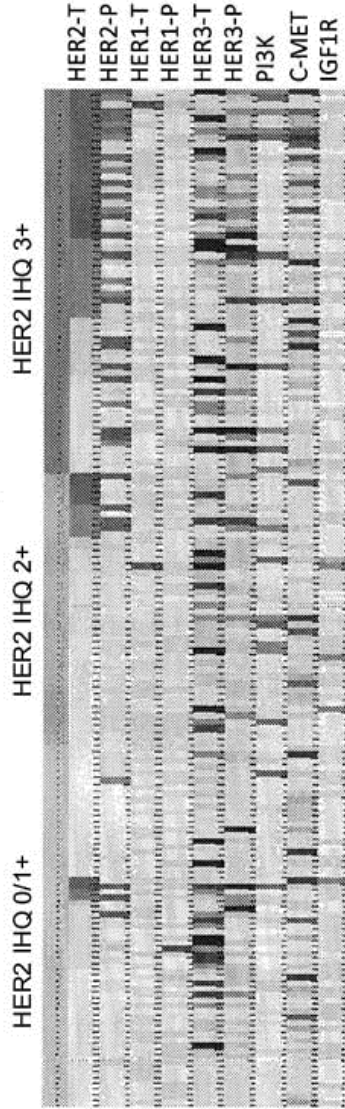


FIG. 7



IHQ HER2	Nº muestra	HER2-T	HER2-P	Nivel relativo	HER1-T	HER3-T
3+	58	50 86,2 %	26 44,8 %	H	2 1,1 %	36 20,7 %
2+	56			M	30 17,2 %	86 153,6 %
0/1+	60			L	142 81,6 %	52 29,9 %

FIG. 8

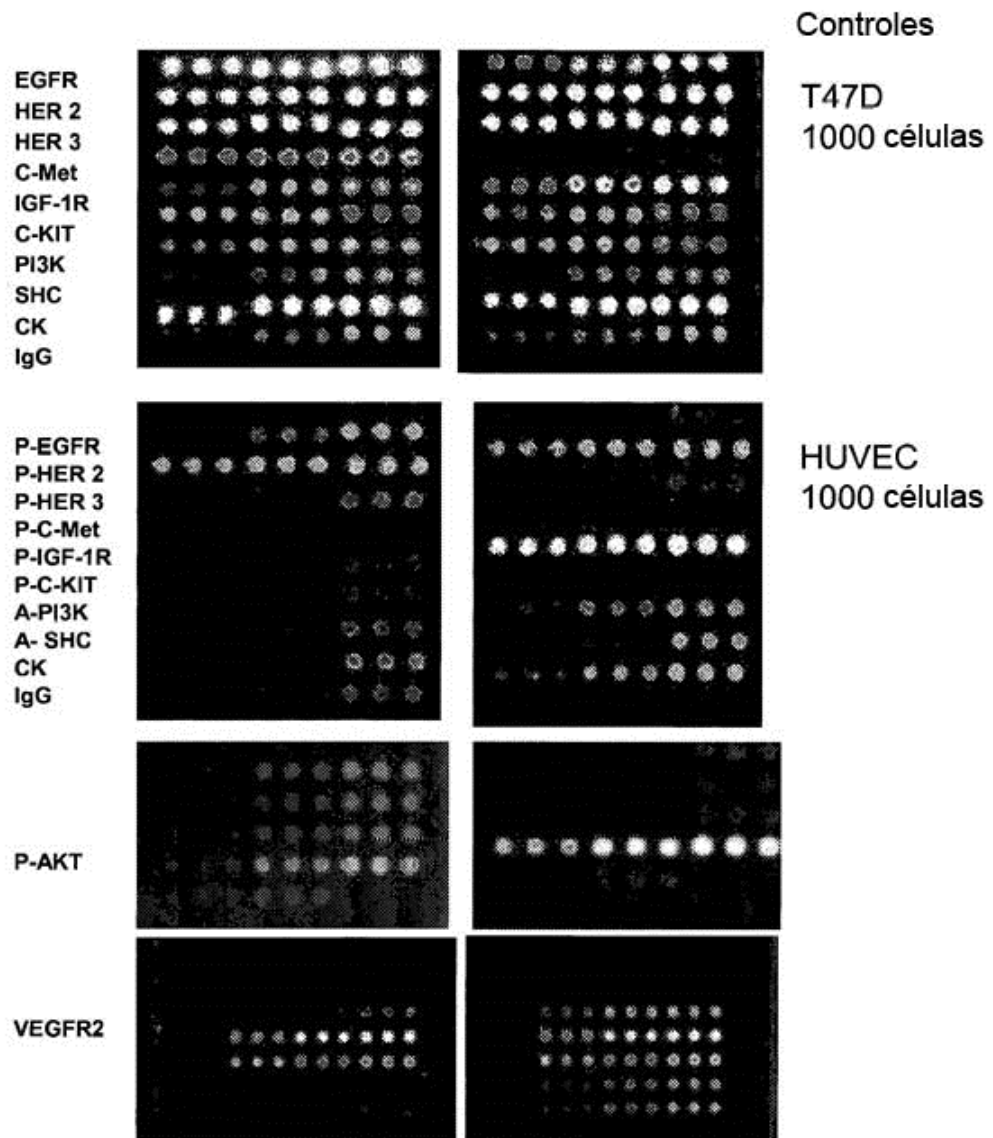


FIG. 9

ES 2 505 466 T3

Clasificación por nombre		Clasificación por valor de p		SSP, alta frente a baja			
Marcador	Prueba de la t Valor de p	Marcador	Prueba de la t Valor de p	Marcador	Sem. prom. Bajo	Sem. prom. Alto	Semanas Dif.
AKT.P	0,683	cKIT.T	0,036	cKIT.T	42,1	20,7	21,4
CK	0,511	VEGFR2.T	0,056	VEGFR2.T	39,9	20,9	19,0
cKIT.P	0,266	HER1.T	0,138	HER1.T	23,4	36,8	-13,4
cKIT.T	0,036	IGF1R.P	0,173	IGF1R.P	36,4	24,1	12,2
cMET.P	0,910	cKIT.P	0,266	cKIT.P	35,1	24,8	10,2
cMET.T	0,608	IGF1R.T	0,401	IGF1R.T	37,0	27,7	9,4
HER1.P	0,444	HER1.P	0,444	HER1.P	36,0	27,7	8,3
HER1.T	0,138	CK	0,511	CK	35,3	28,4	7,0
HER2.P	0,861	HER2.T	0,589	HER2.T	34,8	29,0	5,8
HER2.T	0,589	cMET.T	0,608	cMET.T	34,7	29,1	5,5
HER3.P	0,861	AKT.P	0,683	AKT.P	34,2	29,6	4,6
HER3.T	0,855	PI3K.P	0,733	PI3K.P	34,4	30,4	4,1
IGF1R.P	0,173	MAPK.P	0,733	MAPK.P	34,4	30,4	4,1
IGF1R.T	0,401	HER3.T	0,855	HER3.T	33,0	31,0	2,0
MAPK.P	0,733	HER2.P	0,861	HER2.P	31,2	33,1	-1,9
PI3K.P	0,733	HER3.P	0,861	HER3.P	31,2	33,1	-1,9
VEGFR2.T	0,056	cMET.P	0,910	cMET.P	31,9	32,7	-0,8

FIG. 10

ES 2 505 466 T3

Clasificación por nombre		Clasificación por valor de p		SSP, alto frente a bajo			
Marcador	Wilcoxon Valor de p	Marcador	Wilcoxon Valor de p	Marcador	Sem. prom. Bajo	Sem. prom. Alto	Semanas Dif.
AKT.P	0,277	VEGFR2.T	0,033	VEGFR2.T	39,9	20,9	19,0
CK	1,000	cKIT.T	0,074	cKIT.T	42,1	207	21,4
cKIT.P	0,721	AKT.P	0,277	AKT.P	34,2	29,6	4,6
cKIT.T	0,074	HER1.T	0,404	HER1.T	23,4	36,8	-13,4
cMET.P	0,509	HER1.P	0,423	HER1.P	36,0	27,7	8,3
cMET.T	0,888	IGF1R.T	0,481	IGF1R.T	37,0	27,7	9,4
HER1.P	0,423	cMET.P	0,509	cMET.P	31,9	32,7	-0,8
HER1.T	0,404	IGF1R.P	0,525	IGF1R.P	36,4	24,1	12,2
HER2.P	0,743	HER2.T	0,673	HER2.T	34,8	29,0	5,8
HER2.T	0,673	cKIT.P	0,721	cKIT.P	35,1	24,8	10,2
HER3.P	0,743	HER2.T	0,743	HER2.P	31,2	33,1	-1,9
HER3.T	0,888	HER3.P	0,743	HER3.P	31,2	33,1	-1,9
IGF1R.P	0,525	cMET.T	0,888	cMET.T	34,7	29,1	5,5
IGF1R.T	0,481	HER3.T	0,888	HER3.T	33,0	31,0	2,0
MAPK.P	0,962	MAPK.P	0,962	MAPK.P	34,4	30,4	4,1
PI3K.P	0,962	PI3K.P	0,962	PI3K.P	34,4	30,4	4,1
VEGFR2.T	0,033	CK	1,000	CK	35,3	28,4	7,0

FIG. 11

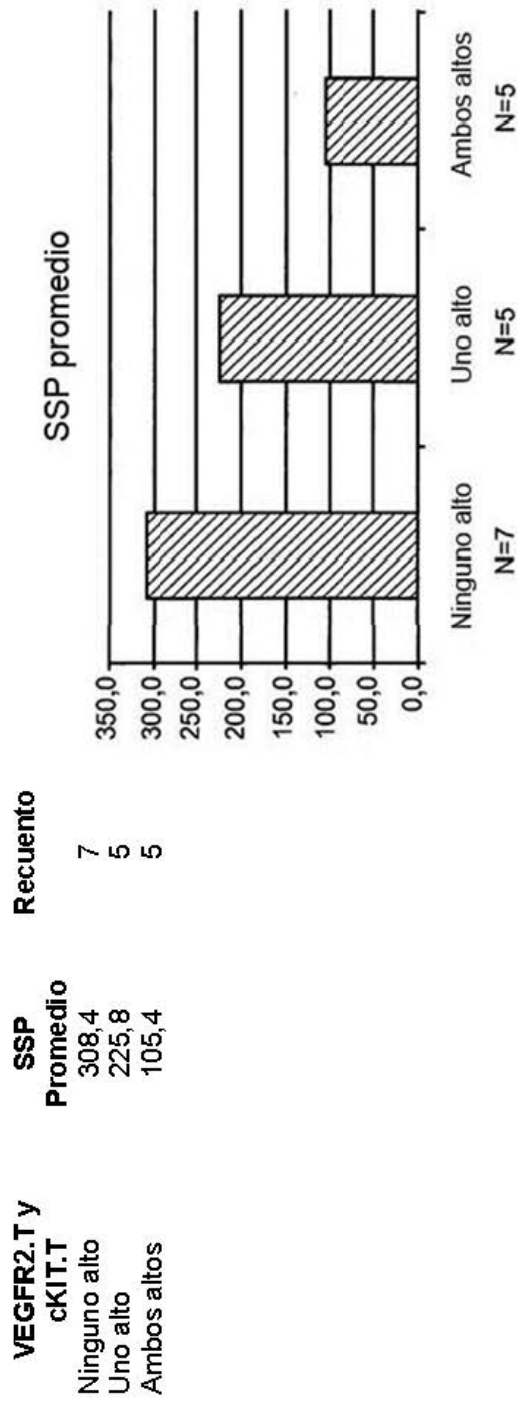
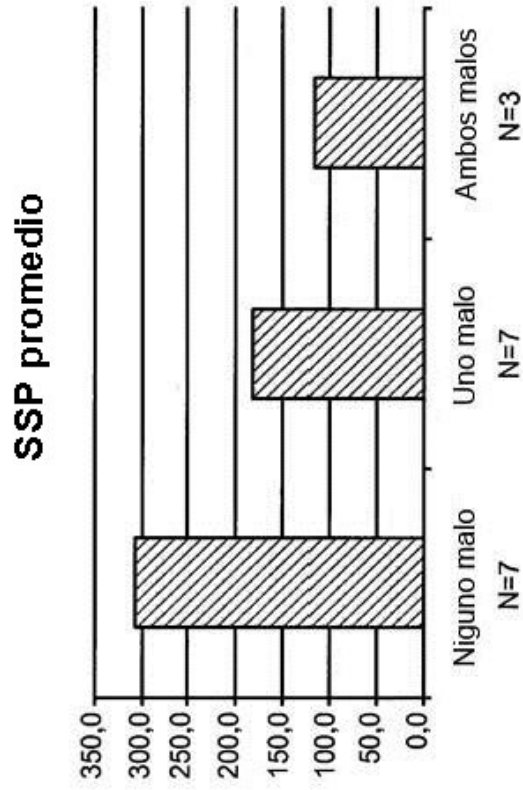


FIG. 12



VEGFR2.T y HER1.T	SSP Promedio	Recuento
Ninguno malo	309,7	7
Uno malo	184,0	7
Ambos malos	119,7	3

VEGFR2.T malo = alto
HER1.T malo = bajo

ANOVA:
p = 0,031 (NIM frente a AM)
p = 0,121

FIG. 13

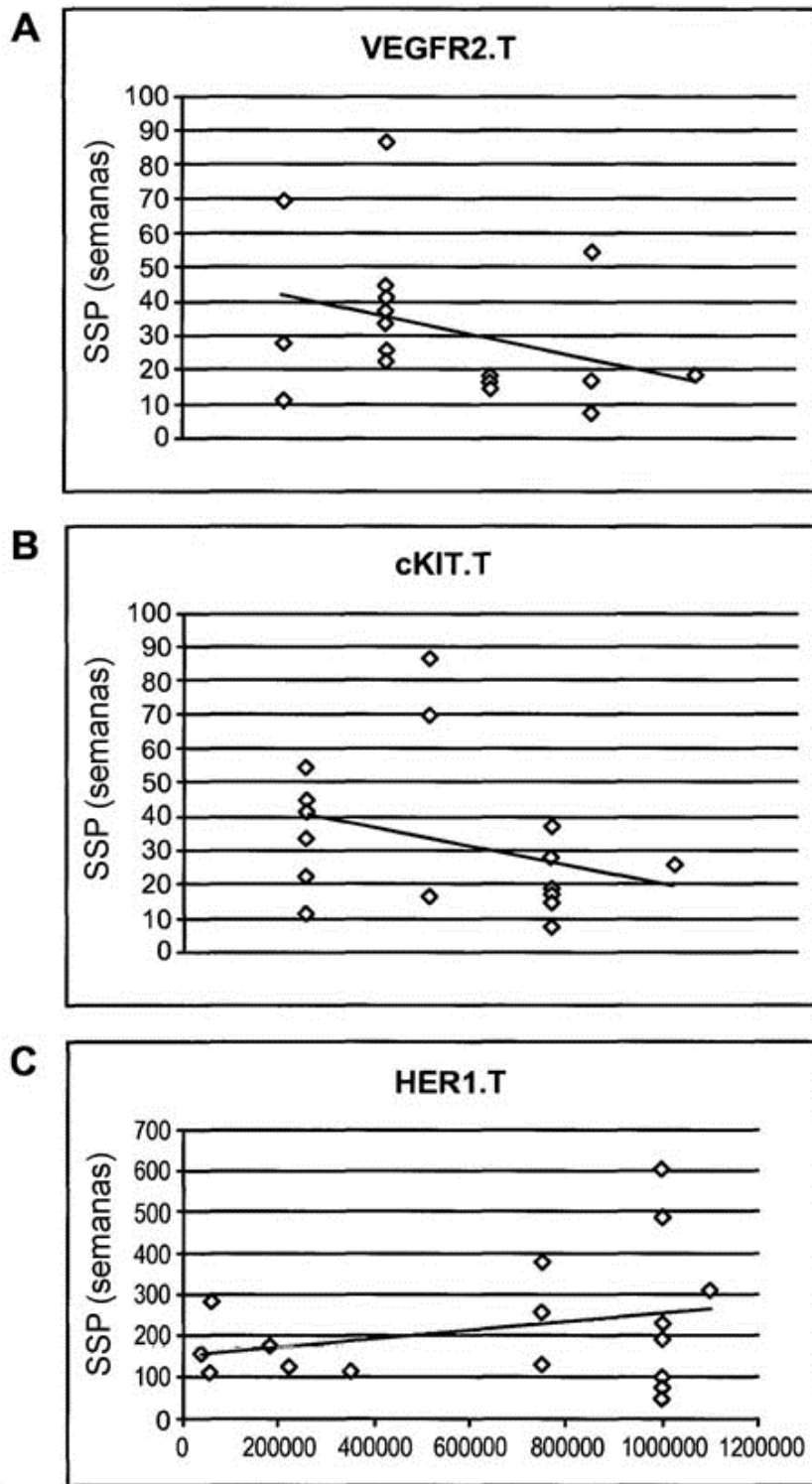


FIG. 14